



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KÜRATİF KEMORADYOTERAPİ UYGULANAN ve CERRAHİ SONRASI
RADYOTERAPİ UYGULANAN BAŞ-BOYUN KANSERLİ HASTALARDA
SİTOGENETİK HASARIN MİKRONÜKLEUS YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

Laman AZİMLİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ayşe ÇİRAKOĞLU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

Temmuz, 2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Laman AZİMLİ tarafından, Doç. Dr. Ayşe Çirakoğlu danışmanlığında hazırlanan **KÜRATİF KEMORADYOTERAPİ UYGULANAN VE CERRAHİ SONRASI RADYOTERAPİ UYGULANAN BAŞ-BOYUN KANSERLİ HASTALARDA SİTOGENETİK HASARIN MİKRONÜKLEUS YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **14/07/2023** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Doç. Dr. Ayşe ÇIRAKOĞLU İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Doç. Dr. Yelda TARKAN ARGÜDEN İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Doç. Dr. Ayşegül KUŞKUCU Yeditepe Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE (Yedek)	Dr. Öğr. Üyesi Çağrı GÜLEÇ İstanbul Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE (Yedek)	Dr. Öğr. Üyesi Onur BAYKARA İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bana desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan babam Asgar AZİMOV, annem
Vesile AZİMOVA'ya ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

KÜRATİF KEMORADYOTERAPİ UYGULANAN VE CERRAHİ SONRASI RADYOTERAPİ UYGULANAN BAŞ-BOYUN KANSERLİ HASTALARDA SİTOGENETİK HASARIN MİKRONÜKLEUS YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 36531

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BÜTÇE DESTEKLERİ	iv
TEŞEKKÜR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	35
2.1 Baş Boyun Kanseri.....	3
2.1.1 BBK anatomisi.....	3
2.1.2.BBK epidemiyolojisi.....	4
2.2.2 BBK etyolojisi ve risk faktörleri.....	5
2.2.2.1. HPV ve BBK.....	5
2.2.2.2. EBV ve BBK.....	6
2.2.2.3. Ağız Sağlığı ve Beslenme.....	6
2.2.2.4. Tütün kullanımı ve BBK.....	7
2.2.2.5. Alkol kullanımı ve BBK.....	7
2.2.2.6. Genetik faktörler ve BBK.....	7
2.1.3 Evreleme sistemi.....	10
2.2 Tedavi yöntemleri.....	15
2.2.1 Cerrahi.....	15

2.2.2 Kemoterapi.....	16
2.2.3 Radyoterapi.....	16
2.2.3.1 Baş boyun kanserlerinde RT'nin oluşturduğu yan etkiler.....	17
2.2.3.2. Radyasyonun Hücresel Etkileri.....	18
2.3 Mikronukleus	23
2.3.1. Mikronukleus Oluşum Nedenleri.....	25
2.3.2 Mikronukleusun Yol Açtığı Sonuçlar.....	27
2.3.3 Mikronukleus İnceleme Yöntemleri.....	28
2.3.4 Mikronukleus Testi Kullanım Alanları.....	32
3. YÖNTEM.....	38
3.1 Olgular.....	37
3.1.1 Tedavi	37
3.2 Yöntem.....	37
3.2.1 Örneklerin <i>Ex Vivo</i> Işınlanması.....	37
3.1.2 CBMN yöntemi.....	37
3.1.2.1 Periferik Kan Kültürü.....	37
3.1.2.2 Kültür Çıkışı.....	38
3.1.2.3 Yayma İşlemi.....	38
3.1.2.4. Boyama İşlemi.....	39
3.1.2.5 Mikroskopik İnceleme.....	39
3.3. İstatistik Analiz Yöntemleri.....	39
3.4 Nükleer Divisyon İndeksinin hesaplanması.....	40
3.5 Kullanılan kimyasallar ve cihazlar.....	40
4. BULGULAR.....	45
Tedavi öncesi ışınlı ve ışısız MN sıklıkları İstatiksel Değerlendirilmesi.....	52
Tedavi öncesi ışınlı ve ışısız ND indeksleri İstatiksel Değerlendirilmesi.....	53
Tedavi gruplarına göre MN sıklıkları İstatiksel Değerlendirilmesi.....	54
Tedavi gruplarına göre ND indeksleri İstatiksel Değerlendirilmesi.....	54
Tedavi zamanlamasına göre MN sıklıkları İstatiksel Değerlendirilmesi.....	55
Tedavi zamanlamasına göre ND indeksleri İstatiksel Değerlendirilmesi.....	55
Yan etkiler ve tedavi aşamalarındaki MN sıklıkları İstatiksel Değerlendirilmesi.....	56
MN sıklık farklarına göre yan etkiler İstatiksel Değerlendirilmesi.....	56
Klinik özellikler ve MN sıklıkları İstatiksel Değerlendirilmesi.....	58
5. TARTIŞMA.....	60

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR.....	66
8	
EKLER.....	91
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	94
ETİK KURUL İZİN YAZISI	93
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1.1: Baş boyun kanserlerinin anatomisi.....	3
Şekil 2.2.2.6: Baş boyun kanserlerinde genetik faktörler.....	8
Şekil 2.2.3.2: Radyasyonun direkt ve indirekt etkisi.....	19
Şekil 2.2.3.2: Radyasyon sonucunda indüklenen tek ve çift zincir kırıkları.....	20
Şekil 2.2.3.2: Sensör ve efektör olarak ikiye ayrılan DNA hasar yanıtları.....	21
Şekil 2.3: Bir, iki ve daha çok MN'ye sahip BN hücreler.....	23
Şekil 2.3.1: Sitotoksik ve Genotoksik ajanların hücre üzerinde etkileri.....	24
Şekil 2.3.1: Kırık/füzyon/köprü döngüsü modeli.....	26
Şekil 2.3.2: Kromotripsis oluşum mekanizması olarak mikronukleus modeli	28
Şekil 2.3.3: BN, NPB ve NBUD.....	30
Şekil 2.3.3.1: A-BN hücre, B-bir mikronukleuslu BN hücre, C-iki mikronukleuslu BN hücrelere örnekler.....	31
Şekil 2.3.3.2: A. 1-2 3N ve B. 1-2 4N hücrelere örnekler.....	32
Şekil 2.3.3.3 . NPB ve NBUD hücrelerine örnekler.....	32
Şekil 2.2.1: RT ve KRT olgu gruplarındaki hastalardan kan alma çizelgesi.....	38
Şekil 3.1: RT, KRT tedavi öncesi ve kontrol grubunun ışınlı ve ışınımsız MN sıklıkları.....	53
Şekil 3.2: RT, KRT tedavi öncesi ve kontrol grubunun ışınlı ve ışınımsız ND indeksleri.....	53
Şekil 3.3: Işınlı ve ışınımsız çalışılmasına göre RT, KRT olgu gruplarındaki MN sıklıkları.....	54
Şekil 3.4: Işınlı ve ışınımsız çalışılmasına göre RT, KRT olgu gruplarındaki ND indeksleri.....	55
Şekil 3.5: Hastaların bireysel MN sıklık farkları.....	57

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1.3.1: HPV kökenli Olmayan Orofarenks kanserinin Klinik ve Patalojik T kategori Evrelemesi.....	10
Tablo 2.3.1.2: HPV kökenli olmayan Orofarenks Kanserinin Klinik N Kategori Evrelemesi...11	11
Tablo 2.3.1.3: Nazal Kavite ve ve Paranasal Sinüs Kanserlerinde Evreleme: Maksiller Sinüs Kanserleri için T kategori Evrelemesi.....12	12
Tablo 2.3.1.4: Nazal Kavite ve Ethmoid Sinüs Karsinomlarında T kategori evrelemesi.....12	12
Tablo 2.3.1.5: Nazal Kavite ve Paranasal Sinüs Kanserlerindeki N kategori evrelemesi.....13	13
Tablo 2.3.1.6: Hipofarenks Kanserler için T kategori evrelemesi.....13	13
Tablo 2.3.1.7: Supraglottik Larenks Kanserlerinde T kategori evrelemesi.....14	14
Tablo 2.3.1.8: Glottik Larenks Kanserlerinde T kategori evrelemesi.....14	14
Tablo 2.3.1.9: Subglottik Larenks Kanserlerinde T kategori evrelemesi.....15	15
Tablo 3.1: RT Uygulanan Olgu Grubunun Cinsiyet, Yaş, Sigara Kullanımı ve TNM evreleri..44	44
Tablo 3.2: KRT Uygulanan Olgu Grubunun Cinsiyet, Yaş, Sigara Kullanımı ve TNM evreleri ..45	45
Tablo 3.3: Kontrol Grubunun Cinsiyet ve Yaş dağılımları.....46	46
Tablo 3.4: RT ve KRT hastalarının MN sıklıkları (%).....47	47
Tablo 3.5: RT ve KRT hastalarının Division indeksleri.....49	49
Tablo 3.6: Kontrol grubunun MN ve ND indeksi.....50	50
Tablo 3.7: RT, KRT ve Kontrol grubuna ait tedavi öncesi, ortası ve sonrasında ışınli ve ışinsız örneklerindeki MN sıklıkları.....51	51
Tablo 3.8: RT, KRT ve Kontrol grubuna ait tedavi öncesi, ortası ve sonrasında ışınli ve ışinsız örneklerindeki ND indeksleri.....52	52
Tablo 3.9: RT ve KRT olgu gruplarının MN sıklık farkları ve yan etkiler.....56	56

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

AJCC: Amerikan Kanser Ortak Komitesi

APC: Adenomatöz Polipozis Koli

ATLD: Ataksi Telenjiektazi Benzeri Bozukluk

ATM: Ataksi Telenjiektazi Mutasyonu

ATR: AT ile İlişkili Kinaz

BAF: Otointegrasyon Bariyeri Faktörü

BBK: Baş Boyun Kanserleri

BLM: Bloom Sendromu RecQ Benzeri Helikaz

BN: Binükleer Hücre

BRCA 1: Meme Kanseri Tip-1 Duyarlılık Proteinini

BRCA 2: Meme Kanseri Tip-2 Duyarlılık Proteinini

CBMN: Sitokinezi Engellenen Mikronukleus Yöntemi

CDK: Siklin Kinazlar

c-erbB-2, Her-2, Erb2B: Reseptör Tirozin-Protein Kinaz

CIN: Kromozomal Kararsızlık

cyt-B: Sitokalsin-B

DDR: DNA Hasar Yanıtı

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nukleik Asit

DNA-PKcs: DNA'ya Bağımlı Protein Kinazlar

DSB: Double Strand Break (Çift Zincir Kırığı)

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EPV: Epstein Barr virüsü

ESCRT-III: Endosomal Sorting Complexes For Transport – III

FBS: Fetal Bovine Serum

GST: Glutasyon S-Transferaz

GSTM1: Glutasyon S-transferaz M1

GSTP1: Glutasyon S-transferaz P1

GSTT1: Glutasyon S-transferaz T1

Gy: Gray

HNSCC: Primer Baş Boyun Yassı Hücreli Karsinom

HPV: İnsan Papilloma Virüsü

HR: Homolog Rekombinasyon Onarım

HR-HPV: Yüksek Riskli İnsan Papilloma Virüsü

HTLV-1: İnsan T-lenfotropik Virüsü 1

HUMN: The HUMAN Micronucleus (Uluslararası İşbirliği Projesi)

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

IL-8: İnterlökin-8

IRIF: İyonize Radyasyonla İndüklenen Odaklar

KCl: Potasyum Klorür

KHDC3L : KH Domain Containing 3 Like

KRT: Kemo-Radyoterapi

KSHV: Kaposi Sarkomu Herpes Virüsü

KT: Kemoterapi

LCR: HPV'de Kodlama Yapmayan Kontrol Bölgesi

MCM2-7: Minikromozom Bakım Protein Kompleksi

MDC1: DNA Hasar Kontrol Noktası Protein 1 Mediyatörü

MIN veya **MSI:** Mikrosatellit Kararsızlığı

MN: Mikronukleus

MPO: Miyeloperoksidaz

MRE11: Çift zincirli kırılma onarım proteini

MRN: Multipl Endokrin Neoplazi

mtDNA: Mitokondriyal DNA

NaCl: Sodyum Klorür

NBS: Nijmegen Kırılma Sendromu

NBS1/hMRE11/hRAD50: Nijmegen Kırılma Sendromundan Sorumlu Protein Kompleksleri

NBUD: Nükleer Tomurcuklar

ND4: NADH Dehidrojenaz Alt Birimi 4

NDi: Nükleer Divisyon İndeksi

NHEJ: Homolog olmayan uç birleştirme

NIN: Nükleotid Kararsızlığı

NPB: Nükleoplazmik Köprüler

P53: Tümör Baskılayıcı Protein

PCC: Prematür Kromozom Kondansasyonu

pRB: Retinoblastom Geni Proteini

RAD50 : DNA onarımında rol oynayan protein kompleksi

RAD51: Radyasyona Duyarlı Rekombinaz 51

RAD-PLAT: Gama Işınlanma ve Sisplatinin Senkronize Etkisi

RB: Retinoblastom Geni

RB1: Retinoblastoma 1

RNA: Ribo Nükleik Asit

RNaseH2: Ribonükleaz H2 Alt Birimi A

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RT: Radyoterapi

SSB: Single Strand Break (Tek Zincir Kırığı)

TBG: Tümör Baskılayıcı Gen

TNF α : Tümör Nekroz Faktörü alfa

TNM: Tümör-Nod-Metastaz

TP53: Tümör Proteini 53

TP53BP1: Tümör Baskılayıcı p53 Bağlayıcı Protein 1

UGT1A10: UDP glukuronosiltransferaz 1 ailesi, polipeptit A10

UGT1A7: UDP Glukuronosiltransferaz 1 Ailesi, Polipeptit A7

UV: Ultraviyole ışınım

XPD: Xeroderma Pigmentosum D

XRCC1: X-ray Repair Cross Complementing Group 1



ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[**Küratif Kemoradyoterapi Uygulanan ve Cerrahi Sonrası Radyoterapi Uygulanan Baş-Boyun Kanserli Hastalarda Sitogenetik Hasarın Mikronükleus Yöntemiyle İncelenmesi**]

[**Laman AZIMLI**]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

[**Danışman : Doç. Dr. Ayşe ÇIRAKOĞLU**]

[Baş boyun kanserleri yılda yarım milyondan fazla tanı ile en yaygın kanser türlerindedir. Tedavide temel olarak radyoterapi (RT) uygulansa da, tümör evresine, boyutuna göre cerrahi rezeksiyon ve kombine kemoterapi de gerektirebilir. Uygulanan radyasyon DNA’da onarılması zor olan çift zincir kırıklarını indükleyerek, hücrede mutasyon, disentrik, asentrik fragmentler gibi kromozom anomalileri ve genomik instabilite oluşturur. Mikronükleus, genomik instabilite göstergesi olarak kabul edilmektedir. Mikronükleus varlığı ve sıklığı, fiziksel, kimyasal ajanların neden olduğu genotoksisitenin gösterilmesinde önemli bir belirteçtir. Ayrıca radyasyon, normal hücrelerde de yapısal DNA değişikliklerine, anomalilere ve kromozom kırıklarına sebep olma özelliğine sahiptir. RT sonucunda hastalarda, normal doku yanıtı olarak, mukozit, dermatit, ağız kuruluğu, yutma güçlüğü, ses kısıklığı, kilo kaybı gibi yan etkiler yaygın olarak görülmektedir. Bu çalışmanın amacı, cerrahi sonrası RT uygulanan hasta grubu ve kemo-radyoterapi (KRT) uygulanan hasta gruplarındaki tedavi sonrası lenfositlerde gelişen kromozom hasarını belirlemek ve bireysel radyotoksisiteleri incelemektir. Çalışmaya 12 RT, 10 KRT uygulanan hasta ve 10 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Hastalardan, tedavi öncesi, tedavi ortası ve tedavi sonunda, kontrol grubundan da bir kez, iki ayrı tüpte alınan kan örneklerinden biri 2 Gy X ışını ile ışınlandıktan sonra, diğeri ışınlanmadan kültüre edilmiş ve CBMN yöntemi

kullanılarak kromozom hasarı incelenmiştir. Işınlı ve ışınsız çalışılan kan örneklerinde görülen MN sıklıkları ile tedavi sırasında oluşan şiddetli yan etkiler arasında ilişki gözlenmiştir. Tedavi öncesi RT ve KRT olgularında MN sıklığının kontrol grubuna göre yüksek olduğu, kendi aralarında bir fark olmadığı gözlenmiştir. Tedavi zamanlamasına göre, RT grubunda tedavi öncesi, tedavi ortası ve tedavi sonu arasında herhangi bir fark bulunmamış, KRT grubunda tedavi öncesi ve tedavi sonu arasında, tedavi ortası ve tedavi sonu arasında MN sıklık farkı bulunmuştur. RT olgu grubunda, tedavi öncesi MN sıklık farkı ile kserostomi, KRT olgu grubunda, tedavi sonu MN sıklık farkı ile disfaji arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. |

Temmuz 2023 , |116| sayfa.

Anahtar kelimeler: |Baş Boyun Kanseri, Mikronukleus, CBMN, Radyoterapi, Kemoradyoterapi, Genotoksisite, Radyotoksisite |

ABSTRACT

[M.Sc. THESIS]

**[Investigation of Cytogenetic Damage by Micronucleus Method in Head And Neck
Cancer Patients Treated Curative Chemoradiotherapy and Post-Operative
Radiotherapy]**

[Laman AZİMLİ]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Medical Biology

[Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Ayşe ÇIRAKOĞLU]

[Head and neck cancers are one of the most common types of cancer, with more than half a million diagnoses per year. Although radiotherapy (RT) is the main treatment, surgical resection and combined chemotherapy may also be required depending on the tumor stage and size. Radiation induces double-strand breaks in DNA that are difficult to repair, resulting in mutations, chromosomal abnormalities such as dicentric and acentric fragments, and genomic instability in the cell. Micronucleus is considered an indicator of genomic instability. The presence and frequency of micronuclei is a marker in demonstrating genotoxicity caused by physical and chemical agents. Radiation also causes structural DNA changes, anomalies, and chromosome breaks in normal cells. As normal tissue response to RT, side effects are commonly seen in patients such as mucositis, dermatitis, dry mouth, dysphagia, xerostomia, and weight loss. The aim of this study is to determine the chromosomal damage at peripheral lymphocytes and to examine the individual radiotoxicity in patients who undergo RT after surgery and chemo-radiotherapy (CRT). The study included 12 RT, 10 CRT patients, and 10

healthy individuals. Blood samples were collected from the patients before, in the middle of the treatment, and at the end of the treatment, and once from the control group, in two separate tubes, one of which was cultured after irradiation with 2 Gy X-rays and the other was cultured without irradiation, and chromosome damage was examined using the CBMN method. A correlation was observed between the frequency of MNs in irradiated, non-irradiated blood samples and severe side effects during treatment. It was observed that the frequency of MN was higher in pretreatment RT and CRT cases compared to the control group, but there was no difference between them. As regards the treatment timing, no difference was found between pre-treatment, mid-treatment, and post-treatment in the RT group, whereas in the CRT group, a difference in MN frequency was found between pre-treatment and post-treatment, mid-treatment, and post-treatment. Significant correlations were found between pre-treatment MN frequency difference and xerostomia in the RT case group and between post-treatment MN frequency difference and dysphagia in the CRT case group. |

July 2023, |116| pages.

Keywords: |Head and Neck Cancers, Micronucleus, CBMN, Radiotherapy, Chemoradiotherapy, Genotoxicity, Radiotoxicity|

1. GİRİŞ

Baş ve boğazın farklı bölgelerinden köken alan, üst solunum ve sindirim sistem bölgelerini etkileyen tümör türlerine genel olarak baş boyun kanserleri (BBK) adı verilmektedir. Dünya çapında yaygın olan kanserlerden biri olup, sık görülen tümörler arasında yedinci sıradadır [1,2]. Her yıl teşhis edilen yarım milyondan fazla vaka insidansı ile yılda 325.000'den fazla kişinin ölümüne neden olmaktadır [1]. BBK'nin %90'ını oral, farenks, larenks ve yassı hücreli karsinom vakaları oluşturmaktadır [1,2]. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre daha fazladır bu da erkeklerin BBK oluşmasına neden olan risk faktörlerine daha çok maruz kalmalarıyla ilişkilidir [1]. Başlıca risk faktörleri arasında tütün ve sigara kullanımı, insan papilloma virüsü (Human Papilloma Virus – HPV), Epstein Barr virüsü (EPV) dahil olmak üzere onkojenik virüsler ve genetik faktörler bulunmaktadır [3]. Bu tümörlerin tedavisi çoğu zaman multisipliner yaklaşım gerektirmektedir [4]. Tedavide, primer tümörün bölgesi ve TNM (Tümör-Nod-Metastaz) evresine göre, cerrahi, radyasyon ve kemoterapi seçenekleri farklı kombinasyonlarda uygulanmaktadır [5,6]. Günümüzde, BBK hastalarının %70-75'i cerrahi rezeksiyon sonrası radyoterapiden faydalanmaktadır [5]. Radyoterapi, kanser hücrelerini öldürmek veya kanser hücresi çoğalmasını kontrol etmek amacıyla kullanılan ve kanser hastalarının klinik, fonksiyonel olarak iyileşmesine katkı sağlayan küratif bir tedavi yöntemidir. Ancak, kanser tedavisindeki faydalı etkilerine rağmen normal dokulara zarar verebilmektedir [4]. Radyasyon kaynaklı DNA hasarı, DNA fragmentasyonu, kromozom kırıklarına ve genomik instabiliteye ve mikronukleus (MN) oluşumuna neden olur [7]. Bu da mutagenез ve karsinogenezle sonuçlanabilmekte ve ikincil kanserlere yol açabilmektedir. MN hücre bölünmesi sırasında hasar görmüş kromozomların veya asentrik parçaların geride kalması ve yavru hücrelerin nukleuslarına katılamaması sonucunda oluşmaktadır [7]. MN oluşumu, fiziksel, biyolojik, kimyasal ajanların neden olduğu genotoksisite için iyi bilinen biyolojik belirteçlerdendir. MN oluşumu genetik kararsızlığın göstergesi olarak kabul edilmekte ve sıklığının artması kanser riskinin öngörülmesini sağlayabileceği bildirilmektedir.

Radyosensitivitede oluşan bireysel farklılıkların belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri Sitokinezi Bloklanmış Mikronukleus (CBMN) yöntemidir. CBMN yönteminde, sitokinez için gerekli olan aktin mikrofilament halkasının oluşumu engellendikten

sonra nükleer bölünmeyi tamamlayan hücrelerin birikmesi görülmektedir, bu da iki çekirdekli (Binukleer; BN) hücrelerin görünümüleriyle tanımlanmaktadır. Bu yöntem telomer uç füzyonlarından veya DNA yanlış tamirinden kaynaklanan disentrik kromozomların bir belirteci olan nükleoplazmik köprüleri (NPB) ölçmek ve gen amplifikasyonun biyobelirteci olan nükleer tomurcukları (NBUD) ölçmek için de kullanılmaktadır [7]. İncelenen her hücrenin sitolojik olarak canlılık durumu (nekroz, apoptoz), kromozom hasarı veya instabilite durumu (MN, NPB, NBUD'ların varlığı ve BN hücrelerin çekirdekleri) açısından puanlanması sitom kavramının ortaya konmasını sağlamıştır. NPB'ler, disentrik kromozomların sentromerlerinin anafazda zıt kutuplara çekilmesi sonucunda oluşmaktadır. Nükleer membran oluşmadan önce disentrik anafaz köprülerini gözlemlemek mümkündür, çünkü hücreler anafaz ve telofaz boyunca ilerleyerek sitokinezini tamamlar, bu da yavru hücreler ayrıldığında NPB'nin kırılmasıyla sonuçlanmaktadır. CBMN yönteminde, NPB'li BN hücrelerin birikmesine izin verilir, çünkü sitokinez inhibe edilir, nükleer membran sonunda kromozomların etrafında oluşur, anafaz köprüsünün NPB olarak gözlenmesine izin vermektedir [7].

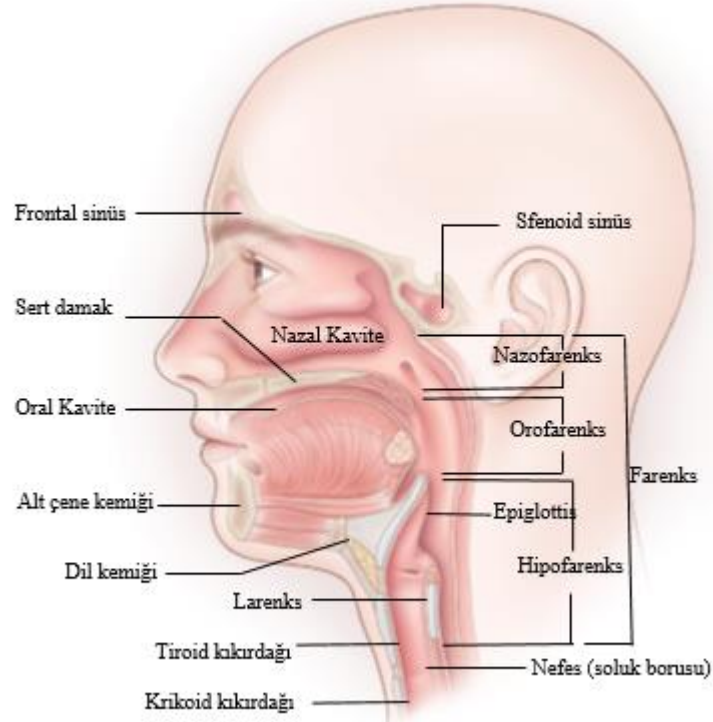
Bu çalışmanın amacı küratif kemoradyoterapi (KRT) ve radyoterapi (RT) tedavisi uygulanan baş boyun kanserli hastalarda oluşacak sitogenetik hasarı kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak incelemektir. Çalışmada, perifer kanı kültürlerinde CBMN yöntemi uygulanarak hem hastaların hem de sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunun doku radyosensitivitesi araştırılacaktır.

2. Genel Bilgiler

2.1 Baş Boyun Kanserleri

BBK, larenks, farenks, ağız boşluğu, paranasal sinüsler ve tükürük bezlerinden kaynaklanan primer tümörleri kendinde birleştirmektedir. Ağız boşluğu kanserleri – ağız içi, dil, diş eti, dilaltı, ağız tabanı, sert damak, dudaklar ve yanakların iç yüzeyinde (bukkal mukoza) olan kanserleri ifade eder. Burun kanserlerine burun deliği içerisi ve burun iç çeperini kapsayan kanserler dahil edilmektedir [8].

2.1.1 BBK anatomisi



Şekil 2.1.1: Baş boyun kanserlerinin anatomisi [8].

BBK, üst solunum ve sindirim sistemi malign tümörlerini kapsar ve oral kavite, tükürük bezleri, burun boşluğu, paranasal sinüsler, farenks (nazofarenks, orofarenks, hipofarenks), larenks ve boyunun üst kısmında olan lenf nodüllerindeki kanserleri içine alır [9].

Nazofarenks, üstte kafa tabanı, ön taraftan nazal kavite, arka taraftan arka faringeal duvar (yutak), altta yumuşak damak, yanda medial pterygoid plaklar ve üst yutak konstriktör kasını kapsar. Çapı yaklaşık 2 cm, yüksekliği 4 cm'dir. [10,11]. Üst solunum sisteminin bileşeni olup, geniz yollarını orofarenks aracılığıyla larenks ve nefes borusuna bağlar. Orta kulakla nazofarenks arasındaki atmosferik basıncın dengelenmesinden, östaki tüpünün açılmasından ve ses rezonansından sorumludur [12,13,14].

Larenks üst sınır tiroid kıkırdak gırtlak kıkırdağı, alt sınır krikoid kıkırdakların oluşturduğu yapıdır ve dil kemiği ile nefes borusu arasında yerleşmiştir. Tiroid kıkırdağı en geniş kıkırdak olup, hava yolunun açık kalmasını sağlar; krikoid kıkırdak hyalen yapıdadır ve halka şeklindedir [15].

Orofarenks, üst taraf yumuşak damak seviyesinden, orta oral kavite; altta dil kökü ve epiglot üst kenarına kadar uzanır [16,17].

Hipofarenks, epiglot üst kenarından krikoid kıkırdağın alt tarafına kadar olan alanı kendisinde birleştirir.

Oral kavite (ağız boşluğu) - Boşluk olmasına rağmen dişetleri ve dişler, yumuşak damağın bir kısmı, dil korpusu gibi alt anatomik bölgeleri içermektedir [16,17].

Nazal kavite (burun boşluğu), üzerinde silyalar bulunan çok katlı yassı epitelden oluşan respiratuar mukoza; yassı epitel ile örtülü olan nazal vestibül alanı ve nöroepitel olfaktor mukoza alanı olmak üzere üç alandan oluşur ve maksiller sinüs, frontal sinüslerin oluşturduğu paranasal sinüsler ve sfenoid sinüs tarafından çevrelenir [18].

2.1.2.BBK epidemiyolojisi

BBK, yılda 660.000'den fazla yeni vaka ve 325.000 ölümle dünya genelinde en yaygın yedinci kanser türüdür. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde BBK genel görülme insidansı artmaya devam etmektedir ve 2030 yılına kadar yıllık %30 artış öngörülmektedir [19,20,21]. Gelişmiş ülkelerde dudak, ağız boşluğu ve yutak kanserlerinin yaklaşık %75'i tütün kullanımı ve alkol tüketiminden kaynaklanmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde dudak, ağız boşluğu ve yutak kanserleri için risk faktörleri arasında tütün, betel çiğnenmesi (orofarenks ve ağız boşluğu

kanserleri), pipo kullanımı, nitrozaminden zengin gıdaların tüketimi ve Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu (nazofarenks kanseri) yer almaktadır. Ayrıca, gelişmiş ülkelerdeki orofaringeal kanserlerin %17 ila %56'sını ve daha az gelişmiş ülkelerdeki orofaringeal kanserlerin daha az bir kısmından (%13), yüksek riskli insan papilloma virüsü (HR-HPV) tipleri (yani, HPV16 ve HPV18) ile enfeksiyonun sorumlu olduğu bildirilmektedir [22].

Erkeklerde BKK'nin görülme sıklığı kadınlara göre daha fazladır ve en yaygın olarak dudak ve oral kavite kanseri görülmektedir [23]. Son zamanlarda oral ve orofarengiyal kanserlerinin erkeklerde görülme insidansı Fransa (%-12,6), Slovakya (%4,0), İspanya (% 10,8), Brezilya (% 26,7), Hong Kong (% 10,5) gibi ülkelerde azaldığı halde, Birleşik Krallık (%18,8), Avustralya (%8,7), Japonya (%21,3) ve ABD'de (%3,7) arttığı gözlenmiştir [24]. Genç kadınlar arasında da Avrupa ülkelerinde tütün ve alkol kullanımından kaynaklı vaka artış sayısı tespit edilmiştir [23,24].

2.2.2 BBK etyolojisi ve risk faktörleri

BBK'nin gelişiminde; sigara ve alkol, immun yetmezlik, beslenme tarzı, ağız sağlığı, radyasyon, yaş, mesleki maruziyet, onkolitik virüsler gibi bazı karsinojenlerin mutajenik etkileri araştırılmıştır. Bugüne kadar, kanser oluşumunda rol oynadığı bilinen 7 tip viral enfeksiyon mevcuttur. Bunlar: İnsan Papilloma virüsü (HPV), Epstein-Barr virüsü (EBV), Kaposi sarkomu herpes virüsü (KSHV), Hepatit B ve C virüsü, İnsan T-lenfotropik virüsü 1 (HTLV-1), Merkel hücreli polyoma virüsüdür [25].

2.2.2.1. HPV ve BBK: Hem kadınları hem de erkekleri etkileyen ve cinsel yolla bulaşan virüslerden olup genital organ kanserleri (rahimağzı, vulva, vajina, penil) ve BBK, özellikle orofarenks kanserleriyle ilişkili olduğu bildirilmektedir [26]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yapılan epidemiyolojik araştırmalar sonucunda HPV'nin 100'den fazla alt tipi olduğu gösterilmiş ve bunlardan 12'sinin kanserojen etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [27]. Yüksek riskli kanserojen olarak sınıflandırılan HPV alt tipleri: HPV 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 ve 59 olarak bilinmektedir [28]. Papillomavirüs genomları, 7,9 kb çift sarmallı dairesel DNA içerir ve protein kodlayan 8 gene ve kodlama yapmayan kontrol bölgesine (LCR) sahiptir [29]. HPV ile ilişkili yassı hücreli baş boyun kanserlerinin çoğu (>%90) HPV 16 varlığından kaynaklanmaktadır. HPV 16 alt tipiyle BBK riskinin araştırıldığı bir vaka-kontrol çalışmasında özellikle orofarengiyal yassı hücreli kanserlerinin birincil nedenlerinden biri olduğu gösterilmiştir [30]. Tüm BBK'lerin %25'inin özellikle orofarengiyal karsinomların HPV ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [31].

HPV hücre bölünmesinin kontrolünde rolü olan genleri baskılayarak hücrelerin kontrolsüz bölünmesine neden olur. Virüsler, bazal tabakadaki keratinositlere yapışır ve mukoza epitelinde küçük yaralar oluşturarak viral enfeksiyonu başlatır. E5, E6, E7 proteinleri tarafından kodlanan genlerde işlevsel bozukluklar meydana gelir [32]. HPV DNA genomunu konak hücre çekirdeğine entegre ederek, E6, E7 onkoproteinlerinin ifadesini bozar [33]. E6 proteini, P53 tümör baskılayıcı proteinin ubiquitin aracılı proteoliz yoluyla bozulmasını uyarır P53 aktivitesinde kayba neden olur. P53'ün inaktivasyonu genomik kararsızlığa neden olmaktadır. E7, bir diğer tümör baskılayıcı olan retinoblastom geni (RB) tarafından kodlanan proteini (pRB) etkisiz hale getirerek hücrenin S fazına girmesine sebep olmakta, böylece hücre döngüsünde bozukluklara, çoğalmaya ve malin transformasyonlara neden olmaktadır [33]. Çoğu BBK olan HPV(+) 10 hücre hattında yapılan genom çapında analizler HPV entegrasyonunun konak genomunda amplifikasyonlar, delesyon, inversiyon ve kromozomal translokasyonlar gibi birçok yeniden düzenlenmeye neden olduğunu göstermiş, genomik instabiliteyi arttırdığı sonucuna varılmıştır [34].

2.2.2.2. EBV ve BBK: Epstein-Barr virüs (EBV veya insan herpes virüsü tip 4; HHV-4) insanları etkileyen yaygın virüslerden biri olmakla tükürük veya diğer vücut sıvıları yoluyla yayılmakta ve enfeksiyöz mononükleoza neden olmaktadır. EBV, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Research on Cancer; IARC) tarafından Burkitt lenfoma, B hücreli lenfoma, Hodgkin lenfoma, mide karsinomu ve nazofarenks kanseri ile ilişkili grup I kanserojen sınıflandırmasına almıştır [35].

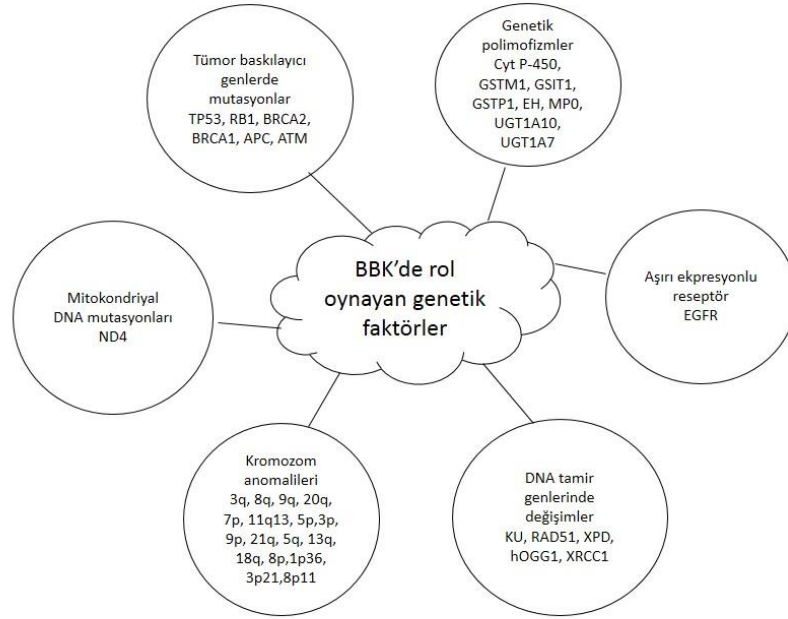
2.2.2.3. Ağız Sağlığı ve Beslenme: Özellikle ağız kanseri riskinin artmasında kötü ağız sağlığının önemi vardır. Ağız sağlığı ve BBK kanseri arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda, diş hekimi ziyaretleri, diş fırçalama, diş ipi kullanımı, diş eti kanaması vb. gibi durumlar araştırılmıştır [36,37,38]. Chang ve ark. tarafından yapılan araştırmada düzenli diş hekimi kontrolüne gidilmeme, 2 defadan az diş temizleme, diş etinde görülen kanamalar gibi durumlar ile BBK arasında pozitif ilişki gösterilmiştir [36]. Diş bakımının aksatılması ağız kanseri ve farengeal kanser riskinde artış ile sonuçlansa da, larengeal kanserle herhangi bir ilişki bulunmamıştır [36]. Rosenquist ve ark. (2005) tarafından yapılan vaka-kontrol çalışmasında çürük diş sayısı, ağız hijyeninin sağlanması oral ve orofarengeal skuamöz hücreli karsinomu için risk faktörü gibi değerlendirilmiştir [38]. Malnütrisiyonu olan ve ağız bakımı kötü olan hastalarda prekanseröz lezyonlarında oran artımı görülmektedir. Winn ve ark. tarafından yapılan araştırmada kadınlarda taze meyve ve sebzeden oluşan diyetin uygulanmasıyla oral

kavite riskinin azaldığı gösterilmiştir [39]. Bosetti ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise yağda kızarmış yiyeceklerin larengeal kanser riskini arttırdığı gözlemlenmiştir [40]. Aynı zamanda tuzlanmış balık gibi yiyeceklerin tüketilmesinin nazofarenks kanser riskini artırdığına dair araştırmalar vardır [41]. Beslenme şekline göre demir eksikliği anemisi gelişen vakalarda hipofarenks kanseri saptanmıştır.

2.2.2.4. Tütün kullanımı ve BBK: Tütün dumanı yaklaşık 5.000 kimyasal madde içerir. Bunlardan bazıları, antijenik, mutajenik, kanserojen, sitotoksik özelliklerde olan, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, N-nitrosaminler, azsarenlerdir [42]. Bunlardan, 6-metil guanin hem çoğalmakta olan hücrelere hem de immun sistem hücrelerine hasar verir [43]. Duman türevleri antiapoptotik molekülleri artırır. İnterlökin-8 (IL-8) ve TNF α gibi genlerin ifadesini ve enflamasyona sebep olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) uyarılmasını sağlar [44]. Birçok BBK'nin tütün kullanımı ile ilişkisi vardır [45] ve uygulanan tedavi sırasında sigara kullanımı kanser tedavisindeki etkinliğin azalmasına sebep olur [46,47]. Aynı zamanda, ikinci primer kanserlerin ortaya çıkması [48,49], kötü sağkalım gibi olumsuz etkilerle sonuçlanır [46,47].

2.2.2.5. Alkol kullanımı ve BBK: BBK kanser tanısı alan ve alkol tüketmeye devam eden vakalarda ikinci primer malinite riskinin arttığı gösterilmiştir [50]. Yapılan araştırmalar alkol tüketmeye devam eden bireylerin kanser nüksü açısından da büyük risk altında olduğunu belirtmektedir [51]. Ayrıca, alkol kullanmaya devam edilmesi, hastalarının gelecekte gastrostomi tüpüyle beslenmeye, çenede osteoradyonekroza ve iş görmede zorluklara sebep olmaktadır [52,53,54,55].

2.2.2.6. Genetik faktörler ve BBK: Çevresel faktörlerle birlikte farklı genetik faktörler de BBK gelişiminde rol oynamaktadır. BBK'de rol oynayan genetik değişimler tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar, genetik polimorfizmler, DNA tamir genlerinde değişimler, epidermal büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonu, mitokondriyal DNA mutasyonları ve kromozom anomalileri başlıkları altında toplanabilir [56].



Şekil 2.2.2.6: Baş boyun kanserlerinde genetik faktörler [56].

Tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar: Tümör baskılayıcı genler (TBG) hücrelerin bölünme süreçlerini kontrol eden genlerdir. Bu genlere *TP53* (tümör proteini 53), *RBI* (retinoblastoma 1), *BRCA 1* (meme kanseri 1), *BRCA 2* (meme kanseri 2), *APC* (adenomatöz polipozis koli), *ATM* (ataksi telenijektazi mutasyonu) vb. örnek olarak verilebilir. BBK'de *TP53* önemli role sahiptir ve mutasyonlarının diğer kansellere göre daha sık olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, BBK'de *TP53* proteini birikimine rastlanmaktadır [57]. BBK'ni çevreleyen mukozada *TP53* geninin aşırı ekspresyonu, ikinci primer tümör olasılığına neden olmaktadır [58]. Kanserle ilişkili belirli bir patojenik özelliğın ortaya çıkmasında rolü olan yüksek penetrasyonlu genlerin sayısı daha azdır ve bu genlerin araştırılması BBK'i genlerinin temelinde duran mekanizmaların aydınlatılması için önem taşımaktadır. Bu genlerin en iyi bilinenleri *BRCA1* geni [59], *APC* geni [60] ve *ATM* [61] genleridir.

Genetik polimorfizmler: Kanser riskindeki bireysel farklılıklar, farklı genlerin normal popülasyonda bulunan belirli varyant alelleri ile ilişkilendirilmektedir. Metabolizma ile ilgili genlerin aktivitesindeki farklılıkların hücrenin karsinojenlere olan duyarlılığını etkilediği bildirilmiştir. Örneğın, ksenobiyotik metabolizmada görevli enzimleri kodlayan genler çevresel karsinojenlerin aktivasyon ve detoksifikasyon süreçlerine katılmaktadır. Aktivasyon, faz I enzimleri (sitokrom P-450) tarafından, detoksifikasyon ise faz II enzimleri (örn. glutatyon transferazlar, N-asetiltransferazlar, epoksit hidrolazlar, sulfotransferazlar) tarafından

gerçekleştirilmektedir [62]. GST (glutasyon S-transferaz) indirgenmiş glutasyonla hücre toksik bileşikleri arasındaki reaksiyonları kataliz eder. Bu genin bireysel varyasyonlarının BBK'ye yakınlık oluşturacağı düşünülmektedir. İnsanlarda, *GSTM1*, *GSTT1* ve *GSTP1* genlerindeki polimorfizmlerin tütün dumanındaki substratlara karşı enzimatik aktivite eksikliği veya azalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [63]. *GSTT1* gen delesyonu baş boyun yassı hücreli karsinomlarla ilişkilendirilmiştir [64,65]. Ksenobiyotiklerin biyodönüşümünde rolü olan proteinleri kodlayan ve BBK ile ilişkili olan diğer bazı genler EH-epoksit hidroksilaz [66,67], miyeloperoksidaz (MPO) [68], *UGT1A7* ve *UGT1A10*'dur [62,69].

DNA tamir genlerinde değişimler: DNA tamir genlerinin aktivitesindeki farklılıklar ise karsinojenlerin neden olduğu genetik materyaldeki hasarın tamirini etkiler. Hasar onarım sürecindeki bozukluklar geri dönüşümü olmayan değişimlere neden olur, tümörigenez sürecini başlatır. DNA tamir genlerindeki bozukluklar ile yumurtalık, mide, meme ve BBK arasında ilişki bulunmuştur [70,71]. Özellikle yanlış eşleşme tamirindeki (mismatch repair) hatalar tütün ve alkol içenlerde BBK'ne yakınlıkla ilişkili bulunmuştur [72]. DNA tamir geni olan *XRCC1* (X-ray repair cross complementing group 1) geni polimorfizmlerinin, görev aldığı baz ekzisyon tamir (BER) sisteminde etkinliğin azalmasına ve tütün ve alkol içenlerde BBK riskinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir [73]. Ayrıca *XPD* (xeroderma pigmentosum D) geninin Lys751Gln polimorfizmlerinin beyin kanserlerine yakınlığı üzerinde etkisi göstermiştir [74]. BBK'nin ileri evrelerinde RAD51 proteini, RAD-PLAT yolu (gama ışınlanma ve sisplatinin senkronize etkisi) aracılığıyla DNA onarımına katılmaktadır [75]. Yapılan çalışmalar [76], RAD-PLAT'ın sisplatin eklentileriyle tek ve çift zincir kırıklarını indüklediğini ve birçok hasar bölgesinin oluşumuna sebep olduğunu göstermiştir. DNA tamir süreçlerinin BBK duyarlılığı ile ilişkisi tedavi yanıtının belirlenmesinde önemlidir.

Epidermal büyüme faktör reseptörlerinin aşırı ekspresyonu: *EGFR* geni insanda 7. Kromozomun kısa kolu (7p) üzerinde yer alır ve proliferasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu genin aşırı ekspresyonu BBK'de kötü sağkalımla ilişkilendirilmiştir [77]. 17.kromozom üzerinde bulunan bir diğer gen c-erbB-2 (Her-2, Erb2B) onkogeninin de aşırı ekspresyonu BBK hastalarının %75'inde gözlenmiş ve kötü sağkalım ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [78].

Mitokondriyal DNA mutasyonları: Mitokondriyal DNA (mtDNA) 16 baz çifti uzunluğunda, dairesel yapılı, çift zincirli bir bileşen olup, 37 gen içermektedir [69].

Mitokondriyal matrikste serbest halde bulunur ve tek kromozom içerir. Koruma mekanizması yoktur fakat reaktif oksijen türleriyle (ROS) etkileşim sonucu olarak oksidatif strese duyarlılık göstermektedirler [79,80]. Mitokondriyal DNA mutasyonlarından biri olan ND4 (NADH dehidrojenaz alt birimi 4) karsinojenlerin metabolizmasında rol oynamakta, fonksiyon bozukluğu ise DNA hasarına yol açmaktadır [81]. Allegra ve ark. tarafından yapılan araştırmada, 9 hastadan alınan 10 BBK'li hücre hattı incelenmiş 8 somatik mutasyon ve 5 polimorfizm tespit edilmiştir [81].

Kromozom anomalileri: BBK biyolojisinde en iyi çalışılan konulardan biri de sık görülen kromozom anomalileridir. 3q, 8q, 9q, 20q, 7p, 11q13 ve 5p amplifikasyonları, 3p, 9p, 21q, 5q, 13q, 18q ve 8p delesyonları ile 1p36, 3p21, 8p11'deki frajil bölgeler bu anomalilerdendir [82]. Y kromozom kaybı ile erkeklerde larenks kanseri insidansının artışı arasında ilişki görülmüştür [83]. Ayrıca, primer baş boyun yassı hücreli karsinom (HNSCC) vakalarının %97'sinde kromozom 3'ün kısa kolunda (3p) kısmi veya tam kayıp olduğu görülmüştür [84]. 11p13 amplifikasyonu ve/veya yeniden düzenlenmesi HNSCC vakalarının %30-60'ında [85,86,87], bcl-1 onkogeninin amplifikasyonu %30-34'ünde [88,89] gösterilmiştir.

2.1.3 Evreleme sistemi

Uygulanan tedavi ve tedavi sonrası sağkalım hastalık evresi yardımıyla belirlenmektedir. Kanserde sınıflama, primer tümör (T), nod (N), uzak metastazın varlığını veya yokluğunu gösteren (M) kriterlerden oluşan TNM olarak yapılmaktadır. TNM sınıflamasının temel amacı kanser ilerlemesini izlemek için anatomik temeli sınıflandırmanın yapılmasıdır. Doğru kanser evreleme, planlanan tedavi seçimi, sonuç tahmini ve kanserin kontrolünde önemli role sahiptir. BBK'lerinde TNM sınıflaması son olarak 2017'de Amerikan Kanser Ortak Komitesi (American Joint Committee on Cancer; AJCC) tarafından güncellenen ve komitenin evreleme için yayınladığı 8.baskıda yer almaktadır [90]. BBK sınıflaması kanserin bulunduğu bölgeye göre farklılıklar gösterebilmektedir.

Tablo 2.1.3.1: HPV kökenli Olmayan Orofarenks kanserinin Klinik ve Patalojik T kategori Evrelemesi [91].

Tx	Primeri bilinmeyen tümör
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör boyutu ≤ 2 cm
T2	Tümör boyutu 2-4 cm
T3	Tümör boyutu >4 cm, epiglottisin lingual yüze uzanımı
T4	Lokal ileri hastalık: tümör larenks, dil kasları, sert damak mandibula veya ötesine invaze
T4a	Lokal ileri hastalık: tümör larenks, dil kasları, sert damak mandibulaya invaze
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık: Tümör lateral pterygoid kas, pterygoid düzlem, lateral nazofarenks veya kafa tabanına invaze

Tablo 2.3.1.2: HPV kökenli olmayan Orofarenks Kanserinin Klinik N Kategori Evrelemesi [91].

NX	Bilinmeyen bölgesel nod varlığı
N0	Bölgesel nod metastazı yoktur
N1	Aynı tarafta ≤ 3 cm tek nod metastazı ve ekstrakapsüler yayılım (-)
N2	Aynı tarafta >3 cm ancak ≤ 6 cm tek nod metastazı ekstrakapsüler yayılım (-) Aynı tarafta ≤ 6 cm olan birden fazla nod metastazı ekstrakapsüler yayılım (-) Karşı tarafta ≤ 6 cm nod metastazı ekstrakapsüler yayılım (-)
N2a	Aynı tarafta >3 cm ancak ≤ 6 cm nod metastazı ekstrakapsüler yayılım (-)
N2b	Aynı tarafta ≤ 6 cm birden fazla nod metastazı ekstrakapsüler yayılım (-)
N2c	Karşı tarafta ≤ 6 cm nod metastazı ekstrakapsüler yayılım (-)

N3	≥6 cm nod metastazı ekstrakapsüler yayılım (-) veya ekstrakapsüler yayılımın olduğu nod metastazı
N3a	≥6 cm nod metastazı ekstrakapsüler yayılım (-)
N3b	Ekstrakapsüler yayılımın olduğu nod metastazı

Tablo 2.3.1.3: Nazal Kavite ve ve Paranasal Sinüs Kanserlerinde Evreleme: Maksiller Sinüs Kanserleri için T kategori Evrelemesi [90].

Tx	Primeri bilinmeyen tümör
Tis	Karsinoma in-situ
T1	Maksiller sinüsle sınırlı tümör
T2	Kemik erozyonu yapan tümör varlığı, sert damak ve/veya orta nazal meatusa invazae
T3	Maksiller sinüsün arka duvarına, pterigoid çukur, cilt altı doku, ethmoid sinüslere invazae
T4	T4a: Lokal ileri hastalık: yanak derisine infratemporal çukura, sfenoid, frontal sinüslere invaze T4b: Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık: Orbita apeksi, beyin parankimi, trigeminal sinirin maksiller dalı dışındaki kranial sinirlerinden herhangi birine invaze

Tablo 2.3.1.4: Nazal Kavite ve Ethmoid Sinüs Karsinomlarında T kategori evrelemesi [90].

Tx	Primeri bilinmeyen tümör
Tis	Karsinoma in-situ
T1	Kemik invazyonu olan veya olmayan herhangi bir bölgeyle sınırlı tümör
T2	İki alt bölgeye invaze eden tümör
T3	Maksiller sinüse, damak, kribriiform plakaya ve orbitanın medial duvarına invaze tümör

T4	<p>T4a: Lokal ileri hastalık: Burun veya yanak derisi, pterigoid plakalar, sfenoid veya frontal sinüslerden herhangi birine invaze tümör</p> <p>T4b: Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık: beyin parankimi, orta kranial çukur, trigeminal sinirin maksiller dalı dışındaki kranial sinirler, nazofarenks ve orbita apeksi, klivusa invaze tümör.</p>
----	---

Tablo 2.3.1.5: Nazal Kavite ve Paranasal Sinüs Kanserlerindeki N kategori evrelemesi [90].

Nx	Değerlendirilemeyen lenf nodu
N0	Metastazı olmayan bölgesel nod varlığı
N1	Boyutu ≤ 3 cm olan aynı tarafta tek lenf nodu ve ekstrakapsüler uzanım (-)
N2	<p>N2a: Boyutu > 3 cm ancak ≤ 6 cm aynı tarafta olan lenf nodu metastazı ve ekstrakapsüler uzanım (-)</p> <p>N2b: Aynı tarafta hiçbiri > 6 cm olmayan birden fazla lenf nodu metastazı ve ekstrakapsüler uzanım (-)</p> <p>N2c: Karşı tarafta hiçbiri > 6 cm olmayan birden fazla lenf nodu metastazı ve ekstrakapsüler uzanım (-)</p>
N3	<p>N3a: Boyutu en büyük > 6 cm olan lenf nodu metastazı ve ekstrakapsüler uzanım (-)</p> <p>N3b: Herhangi büyüklükte lenf nodu varlığı ve ekstrakapsüler uzanım vardır.</p>

Hipofarenks Kanserinde Evreleme:

Hipofarenks kanserleri için bölgesel nod evrelemesi nazal kavite ve paranasal sinüs kanserleri için düzenlenen nod evrelemesiyle aynı şekilde yapılmaktadır. Uzak Metastaz varlığına göre M0 (uzak metastaz var), M1 (uzak metastaz yok) M evrelemesi yapılmaktadır. Hipofarenks ve oral kavite kanserleri için anatomik evrelendirme aynıdır.

Tablo 2.3.1.6: Hipofarenks Kanserler için T kategori evrelemesi [90].

Tx	Bilinmeyen primer tümör
Tis	Karsinoma in-situ
T1	Boyutu ≤ 2 cm hipofarenksin bir alt bölgesiyle sınırlı tümör
T2	Boyutu 2-4 cm hipofarenksin birden fazla alt bölgesiyle sınırlı tümör
T3	Boyutu >4 cm veya hemilarenks fiksasyonu olan, özofagus invazyonu olan tümör.
T4a	Lokal ileri hastalık: krikoid kıkırdağı, tümör tiroid kıkırdağı, hyoid kemiği, özofagusun kas dokusu, prelarengal kasları ve cilt altı yağ dokuya invaze
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık: prevertebral fasyaya invaze

Larenks Kanserlerinde Evreleme: Subglottik, glottik ve supraglottik larenks kanserleri bir birilerinden farklı oldukları için primer tümör evrelemesi de farklı olarak düzenlenmektedir.

Tablo 2.3.1.7: Supraglottik Larenks Kanserlerinde T kategori evrelemesi [90].

Tx	Primeri bilinmeyen tümör
Tis	Karsinoma in-situ
T1	Supraglottisin bir alt bölgesine sınırlı tümör
T2	Supraglottisin birden fazla alt bölgesine veya glottis, supraglottis dışında bir bölgeye invaze tümör
T3	Postkrikoid alan, preepiglottik boşluk, paraglottik boşluk ve tiroid kıkırdağın iç korteksin invaze eden tümör
T4a	Lokal ileri hastalık: tiroid kıkırdağın dış korteksinin dışına, larenks dışı dokulara invaze

T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık: prevertebral alana invaze
-----	---

Tablo 2.3.1.8: Glottik Larenks Kanserlerinde T kategori evrelemesi [90].

Tx	Primeri bilinmeyen tümör
Tis	Karsinoma in-situ
T1	Vokal kord(lar)a sınırlı tümör
T1a	Bir vokal kordla sınırlı tümör
T1b	Her iki vokal kordla sınırlı tümör
T2	Supraglottis ve/veya subglottise uzanan tümör
T3	Vokal kord fiksasyonu ile larenksle sınırlı tümör
T4a	Lokal ileri hastalık: tiroid kıkırdağın dış korteksinin dışına, larenks dışı dokulara (trakea, boyun yumuşak dokusu, tiroid, özefagus) invaze
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık: prevertebral alana invaze

Tablo 2.3.1.9: Subglottik Larenks Kanserlerinde T kategori evrelemesi [90].

Tx	Bilinmeyen primer tümör
Tis	Karsinoma in-situ
T1	Subglottisle sınırlı tümör
T2	Vokal kord(lar)a uzanan tümör
T3	Vokal kord fiksasyonu ile larenksle sınırlı tümör
T4a	Lokal ileri hastalık: tiroid kıkırdağın dış korteksinin dışına, larenks dışı dokulara (trakea, boyun yumuşak dokusu, tiroid, özefagus) invaze
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık: prevertebral alana invaze

2.2 Tedavi yöntemleri

2.2.1 Cerrahi

Cerrahi rezeksiyon BBK hastaları için tedavinin önemli parçasıdır [92]. Genellikle erken evre kanserlerinde tek tedavi (cerrahi veya radyoterapi), ileri evre kanserlerinde kombine tedavi (cerrahi, radyoterapi, kemoterapi) uygulanmaktadır [93,94]. Ağız boşluğu kanseri hastalarının %15-30'unda ameliyat sonrası görülmekte olan pozitif rezeksiyon marjinleri kötü sonuçlarla ilişkilidir ve ek tedavi gerektirmektedir [95,96]. Ayrıca, cerrahi işlem uygulandığı zaman tespit edilemeyen ek primer maligniteler vardır ve bunlar BBK'inde önde gelen ölüm sebeplerinden biridir [97].

2.2.2 Kemoterapi

BBK'de tümör evresine göre, radyoterapi (RT), kemoterapi (KT) tedavi yöntemleri belirlenir. Lokal ilerlemiş tümörlerde cerrahi işlemle birlikte adjuvant RT, kemoradyoterapi (KRT) veya definitif KRT uygulanmaktadır. Ancak cerrahi yaklaşımlara duyarlı olmayan metastatik tümörler için kemoterapi veya immünoterapi göz önünde bulundurulmaktadır. KT, hastalığın kimyasallarla tedavi edilmesine dayanmaktadır ve 1900'lerin başında geliştirilmiştir [98]. Platin bazlı bileşikler, sisplatin, 5-florourasil vb. kemoterapötik ilaçlar lokal olarak ilerlemiş, tekrarlayan/metastatik BBK tedavisinde kullanılan ajanlardır [99]. RT gibi kemoterapi de hızla bölünen hücreleri hedef alarak hücre bölünmesinin bozulmasına sebep olur. Radyasyon tedavisi sırasında uygulanan ışın lokal hasarlara neden olurken, kemoterapi hızla büyüyen kanser dışı hücrelerde sitotoksik etki gösterir. KRT tedavisinde kronik rinosinüzit, mukosilyer klirens ve koku değişiklikleri sık görülen yan etkilerdendir [98]. Ayrıca hastalarda, yaşam kalitelerini etkileyen yorgunluk, mide bulantısı, alopesi, anemi gibi yan etkiler görülebilmektedir.

2.2.3 Radyoterapi

Radyasyon elektromanyetik dalgalar (X ve γ ışınları) aracılığıyla enerjinin başka bir ortama yayılması olarak bilinmektedir [100]. 1895 yılında Wilhelm Conrad Roentgen tarafından X-ışınlarını keşfedildi. Radyasyonun tedavide kullanılmasına aynı yıl Emil Grubbe tarafından meme kanserinde, 1896 yılında ise Voigt J. Ärztlicher Verein tarafından nazofarenks

kanserinde başlanmıştır. 1897 yılında Thompson tarafından elektronlar, 1898 yılında Pierre ve Marie Curie tarafından radyum keşfedilmiştir. X ışınlarının özellikleri 1906 yılında G.Barkla tarafından tanımlanmıştır. Günümüzde kanser vakalarının %50-60'ının tedavisinde ya multidisipliner yaklaşımla (cerrahi, tıbbi onkoloji, nükleer tıp) birlikte ya da tek başına radyoterapi (RT) planlanmaktadır [101].

Amaca göre farklı RT uygulamaları kullanılmaktadır: *Küratif RT*, etkin tedaviye yönelik RT uygulaması olup, erken evre Hodgkin lenfoma, nazofarenks, erken glotti kanserleri ve bazı cilt kanserlerinde kullanılmaktadır. *Palyatif RT*, hastalığa bağlı semptomların ortadan kaldırılmasını amaçlayan, beyin ve kemik metastazı vakalarında uygulanmaktadır. *Profilaktik RT*, koruma amaçlı, metastaz veya nükslerin önlenmesi amacıyla, akut lenfoblastik lösemi ve küçük hücreli akciğer kanserlerinde planlanmaktadır. *Total vücut ışınlanması*, lösemik hücreleri yok etmek, bağışıklık sistemini baskılamak ve kemik iliği nakli sırasında nakil olunacak hücreler için alanı temizlemek amacıyla uygulanır. *Neoadjuvan RT*, ilk aşama olarak, esas tedavi yönteminden önce (genellikle cerrahi) tümör boyutlarını küçültmek için uygulanan tedaviyi ifade eder. *Radyokemoterapi* veya *kemoradyoterapi*, RT ve KRT'nin eş zamanlı olarak verilmesidir [102].

2.2.3.1 Baş boyun kanserlerinde RT'nin oluşturduğu yan etkiler

BBK'de lokal olarak uygulanan bir tedavi yöntemi olan RT, tümör evresine göre tek başına ya da cerrahi sonrası veya kemoterapiyle eşzamanlı olarak planlanır. Tedavi sırasında (akut) ya da sonrasında (kronik) kişiden kişiye değişen yan etkiler ortaya çıkabilir, bunların bazıları daha sık (iştahsızlık, halsizlik) bazıları ise nadir görülebilir. Erken yan etkilerin geç yan etkilerden farklı olarak çoğu geçicidir ve tedavi bittiğinde iyileşir. RT uygulandığı zaman mukoza iltihabı (mukozit), ağız kuruluğu (ksereostomi), dermatit, yutma güçlüğü (disfaji), otit (kulak iltihabı), eritem (ciltte kızarıklık), epilasyon (kıl dökülmesi), ciltte pul pul dökülme, ülserleşme, kanama (primer tümöre bağlı kanama), halsizlik, kan değerlerinde düşme, göz yaşarması-kızarması ve larenks ödeminden kaynaklanan ses kısıklığı, tat almada bozukluk gibi akut yan etkiler gelişebilmektedir [103,104]. RT alan BBK hastalarının %90'ında ağız kuruluğu, çiğneme, konuşma zorluğu, tat kaybı ve ağız ve diş hijyeninin bozulması gibi etkiler [105,106], %50'sinde ise diş çürüğü, trismus (çene kilitlenmesi) riskini artıran oral mukozit, dermatit, disfaji görülmektedir [107].

Parotis, sublingual, minör tükürük bezleri ve submandibular RT sırasında etkilendiği için ani ağız kuruluğu yaygın etkilerden biridir. Şiddeti ve kroniklik derecesi, planlanmış doza, tükürük bezlerinin radyasyon sahasında kalmasına göre değişmektedir. Osteoradyonekroz, yüksek radyasyon dozu planlanmış hastalar için yaşam boyu süren risk oluşturan ve cerrahi müdahale gerektirebilen yan etkilerdendir [108]. Nazofarenks hastaları için mandibula sık etkilenen kemiktir. RT tedavisinden 8-12 hafta sonra başlayan ve ömür boyu sorun teşkil eden fibrozis dokunun kalınlaşması ve sertleşmesidir, belirlenen tedavi alanına göre derialtı dokuda, ciltte, kas ve diğer organlarda görülebilir [109,110]. Hem kozmetik hem de fonksiyonel bozulmaya neden olarak yaşam kalitesini bozar. Dil tabanı, bademcik, yumuşak damak, masseter kasları, retromolar trigon, temporomandibuler eklem, pterygoid kasların radyasyona maruziyeti sonucunda çene kilitlenmesi meydana gelebilmektedir. Çene kilitlenmesi riski, artmış radyasyon dozuyla ilişkilidir ve 60 Gy'yi aşan dozlar neden olabilmektedir [111]. Faringoözofageal stenoz, özofagusun farinkse bağlandığı yerde darlık oluşmasıdır ve bu darlık özellikle sert yiyeceklerin tüketilmesini zorlaştırır, mide tüpü kullanımına sebep olur. Lenfödem, radyasyondan etkilenen dokuların kronik iltihaplanması sonucunda oluşabilmektedir. RT'den 8-12 hafta sonra lenfödem etkileri başlar, ve ömür boyu sürebilme ihtimali vardır. Lenfödem hem deri ve yumuşak doku hem de faringeal laringeal mukozada oluşabilir ve nefes almada zorluk çekilmesine, kulak ağrısı, ses ve yutma sorunları, psikolojik sorunlara (depresyon ve b.) yol açabilir. Hipotiroidizm, radyasyona bağlı kişiden kişiye değişebilen yan etkilerdendir. Bazı hastalarda herhangi bir semptomu rastlanmazken, bazı hastalarda hayati risk taşımaktadır. Kulakta hasar (Ototoksisite) ve işitme kaybı, özellikle 60 Gy radyasyon dozu alan hastalarda sıklıkla belirtilen şikayetlerdendir [112]. Ototoksisiteye bağlı olarak kulak ağrısı, işitmede zorluk, kulak çınlaması gibi sorunlar oluşabilmekte ve orta kulakta sıvı toplanması seröz otite yol açabilmektedir. Yüksek doz radyasyon, iç kulak, işitme siniri, vestibüler sistemde hasarlar meydana getirebilir bu da işitme kaybıyla sonuçlanır [113].

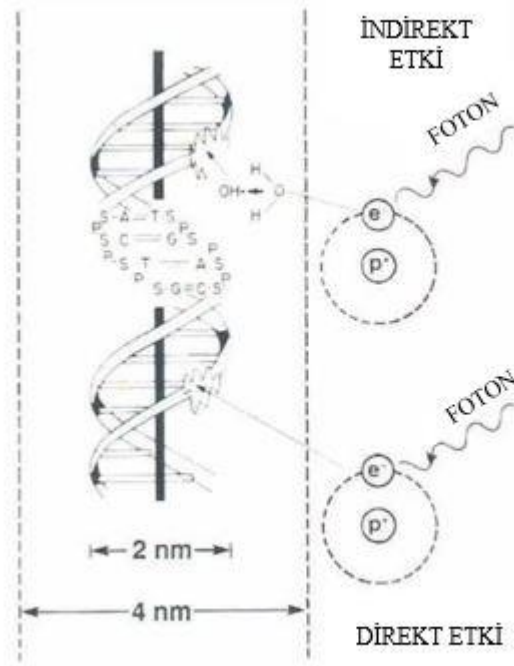
2.2.3.2. Radyasyonun Hücresel Etkileri

Radyasyonun başlıca hedefi DNA'dır. Nukleus ve bölünen kromozomların radyasyona duyarlılığı hücre sitoplazmasından daha fazladır, ancak yapılan yeni çalışmalar sitoplazma hedefli ışınlamanın da nukleer düzeyde hasara sebep olabileceği bildirilmiştir [114,115,116,117]. Dokulara verilen iyonize radyasyon doğrudan DNA ile etkileşimde bulunarak hücre ölümüne sebep olabilir (direkt etki) ya da diğer moleküllerle, özellikle de su

ile etkileşime girerek DNA hedeflerine zarar verecek reaktif oksidatif stres (ROS) oluşturur (indirekt etki) [118].

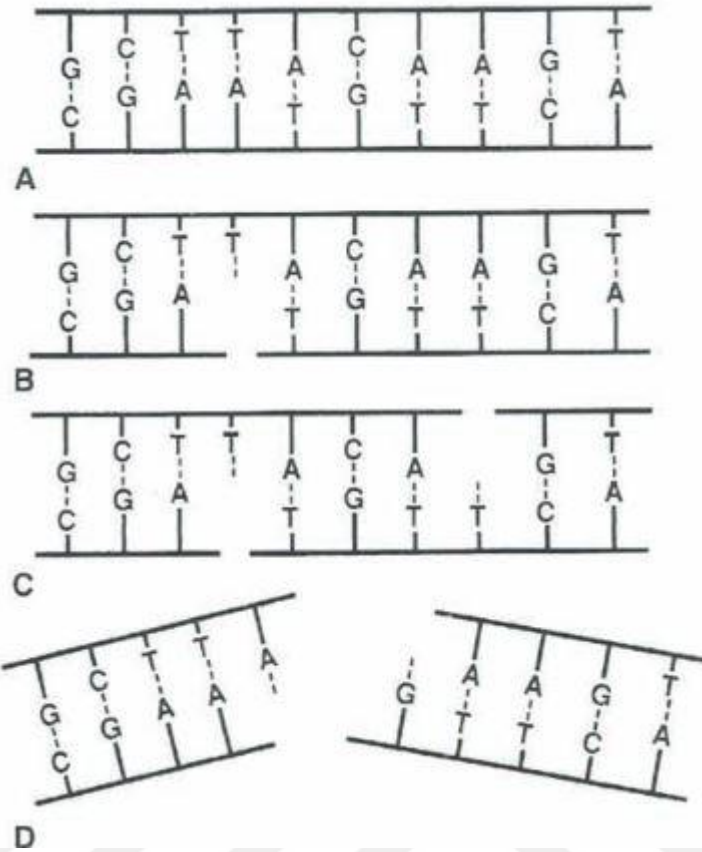
Radyasyonun direkt etkisi iyonizasyon oluşturmasıyla karakterizedir. (Şekil 2.2.3.2) Yüksek doz gama ışını DNA yapısında iki parça oluşturur. DNA moleküllerindeki atomların doğrudan etkilenecek iyonlaşması fotoelektrik etki ve “Compton Etkisi” veya “Compton Saçılması” yoluyla enerji emiliminin sonucu olarak bilinmektedir. Purin halkalarının açılması, fosfodiester bağlarının kırılması DNA'nın tek zincirinde veya her ikisinde kırığa neden olur [119].

Radyasyonun indirekt etkisi, direkt etkiden farklı olarak, DNA'yla değil de vücut içerisinde moleküllerle etkileşim yaratarak bu molekülleri iyonize etmesidir. İnsan vücudunun %70'i su olduğundan, bu etki radyasyonun su molekülleriyle etkileşiminden ve serbest radikaller yaratmasından kaynaklanmaktadır. Serbest radikal, nötr atomlar olup yüksek reaktiviteli ve elektrofilik gruplardır [119,120]. Serbest radikaller (H veya OH) kısa ömürlü ($10^{-10}s$) olduklarından sitoplazmadan DNA'nın bulunduğu nukleusa göç edemez ve O_2 ile birleşerek daha uzun ömürlü, güçlü radikale H_2O_2 (hidrojen peroksit) dönüşürler. H_2O_2 daha uzun ömürlü ($10^{-5}s$) olsa bile göç etmeme özelliklerine sahiptir ve komşu dokuların veya hücrelerin beslenmesini çevresindeki molekülleri okside ederek engellerler. Besin eksikliği veya hücrelerin dokulardan izolasyonu hücre ölümüyle sonuçlanır [121].



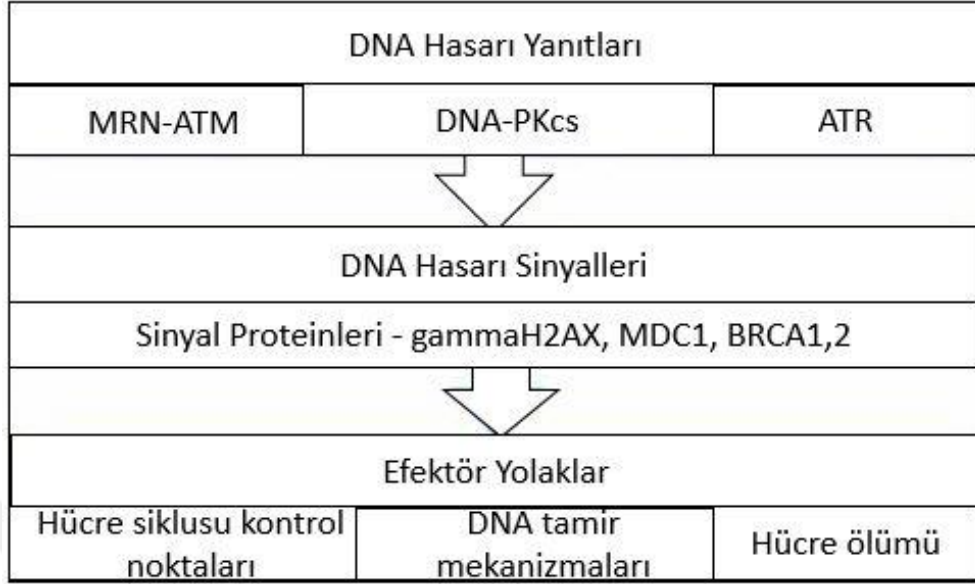
Şekil 2.2.3.2: Radyasyonun direkt ve indirekt etkisi [122].

Halliwell'e göre ROS'tan kaynaklanan DNA hasarının temelinde 2 mekanizma vardır: bunlar; hidroksil radikalının oluşturduğu DNA zincir kırılması, deoksiriboz fragmentasyonu ve baz modifikasyonu ve oksidatif stres sonucu DNA fragmentlerinin oluşmasıdır [123].



Şekil 2.2.3.2: Radyasyon sonucunda indüklenen tek ve çift zincir kırıkları. A: Genetik materyali taşıyan normal DNA zinciri B: Bir zincirdeki karşı zincirin kullanılması sonucunda oluşan, onarılması kolay kırılma C: Her iki zincirdeki kırılma D: Bir birine yakın çift zincir kırılması [122].

Radyasyonun DNA'da oluşturduğu hasarlar arasında oksitlenmiş baz hasarı, abazik bölgeler, tek zincir kırıkları (SSB'ler) ve kromozomlarda anomalilere yol açan çift zincir kırıkları (DSB'ler) yer almaktadır. İyonize radyasyona yanıt sisteminde DNA hasar sensör ve transdüksiyon proteinleri görev alır. Örneğin, ATM (ataxia telanjiektazi mutated), ATR (AT ile ilişkili kinaz) ve DNA'ya bağımlı protein kinazlar (DNA-PKcs) hasar sinyalini algılayıp, programlı hücre ölümü, DNA tamir yolları veya hücre döngüsü kontrol noktalarına iletirler [122]. DNA hasarının algılanmasında ve onarımında Rad24p, fosforile olmuş H2AX, gammaH2AX (γ H2AX), NBS1/hMRE11/hRAD50 kompleksi, MDC1 proteini, tümör baskılayıcı p53 bağlayıcı protein 1 veya 53BP1 proteinleri de işlev görür [124].



Şekil 2.2.3.2: Sensör ve efektör olarak ikiye ayrılan DNA hasar yanıtları [122].

DSB'lere verilen ilk hücresele yanıt çok sayıda proteinin DNA hasar bölgesine fiziksel olarak toplanmasını içerir. Bu subnükleer bölgeler iyonize radyasyonla indüklenen odaklar (IRIF) olarak isimlendirilir. Bu odaklarda DNA onarımı ve diğer efektörlere sinyal gönderimi gerçekleşmektedir. MRE11, RAD50-NBS1 (MRN) kompleksinin ATM'yi DSB'ye bağlayan temel DSB sensörü olduğuna işaret etmektedir [125]. DNA hasar yanıtında meydana geldiği bilinen bir diğer olay, DSB oluşumundan sonraki birkaç dakika içinde histon H2AX adı verilen bir proteinin fosforilasyonudur. H2AX'in fosforile formunun DNA hasar yanıtında yer alan birçok proteinin işlevinde ve IRIF oluşmasında rolü vardır [126]. ATM radyasyon sonrası üç hücre döngüsü kontrol noktasında durmayı düzenlediğinden, hücrelere DNA onarımı için süre sağlar ve hasarlı hücrelerin çoğalmasını önler. ATM proteini olmayan hücrelerde ise alternatif DSB algılama mekanizması mevcuttur [127]. Bu algılama, Ku70-ku80 kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir [128,129]. Üçüncü bir DNA hasarı algılama mekanizması ise SSB'ler ve replikasyon çatallarının durması gibi diğer DNA hasarı türlerine yanıt olarak H2AX'in fosforilasyonunda rol oynayan ATR'dır [125].

DSB algılama mekanizmalarındaki hatalar radyosensitive artışına ve maliniteye neden olmaktadır. ATM gen mutasyonu sonucu oluşan ve otozomal resesif bir hastalık olan ataksi telenjiektazide ilerleyici serebellar ataksi, okülokütanöz telenjiektazi, immün yetmezlik ve yüksek malinite insidansı görülür. Ayrıca hücre döngüsü kontrolü ve DNA onarım mekanizmalarındaki kusurlar nedeniyle hastalar radyasyona daha duyarlıdırlar [130].

Radyasyona duyarlı bir diğer genetik hastalık olan Nijmegen kırılma (breakage) sendromundan sorumlu gen NBS1, DNA onarımı ve hücre döngüsü kontrolünde rolü olan MRN kompleksinin bir parçasıdır [131]. Ayrıca, Ataksi telenjektazi benzeri bozukluk (ATLD) ve Fanconi anemisi gibi durumlar da DNA hasar yanıtında (DNA Damage Response; DDR) hatalarla ilişkilendirilmiştir [132]. Bu bozuklukların birçoğunda kansere yatkınlık, radyoterapi ve kemoterapiye duyarlılık artışı görülmektedir [132].

Hücrede DNA hasarının tanınmasına yönelik mekanizmalar vardır. İyonize Radyasyona yanıt olarak hücre koordineli sisteme sahiptir. ATM, DNA-PK'lar ve ATR'nin aktivasyonu, H2AX ile birlikte çok sayıda proteinin fosforilasyonuna yol açarak birçok DDR yolağının aktivasyonuna yol açar. Başlıca üç yolak apoptoz, DNA çift zincir tamiri ve hücre döngüsü kontrol noktalarıdır.

1. Apoptoz (programlı hücre ölümü): DNA hasarı zararlı mutasyonlara yol açabileceğinden, bazı durumlarda hasarı onarmaya çalışmak yerine hücreyi ortadan kaldırmak organizma için daha yararlı olabilir. Apoptoz, programlı hücre ölümüdür ve nekrozdan farklı olarak, hücre içeriği, çevredeki hücrelerde hasara yol açmadan uzaklaştırılabilmesi için fagositik hücrelerin yutabildiği, apoptotik cisimler olarak adlandırılan parçalara dönüşür [133].
2. DNA çift zincir tamiri: Hücre için radyasyonun oluşturduğu DNA hasar tamirinin iki yolu mevcuttur. Biri Homolog Rekombinasyon Tamir (Homologous Recombination Repair; HR) mekanizmasıdır. HR olmayan hücreler DNA çapraz bağlama ajanlarına karşı hassas ve radyosensitifdirler [134]. Homolog olmayan uç birleştirmede (Non-homologous end joining; NHEJ) ise iki DNA çift zincir kırık ucu homolog bir DNA dizisi gerektirmeden birleştirilir. Tüm hücre döngüsü boyunca meydana gelebilir, ancak daha aktif olduğu aşama G1 fazı olarak bilinmektedir. Bu, HR'den daha hızlı ancak daha az doğru bir süreçtir ve genellikle kırılma bölgesinde küçük delesyonlar veya insersiyonlar meydana gelir. Bu durum mutasyonlara yol açabilse de hücrenin hayatta kalmasını sağlar [135].

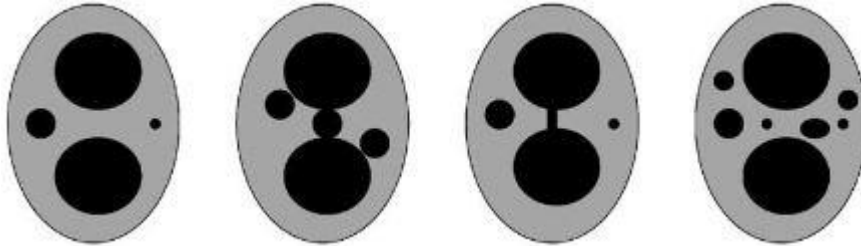
DNA çift zincir tamirlerinde γ H2AX, 53BP1, NBS1, BRCA1/2 ve Ku proteoin kompleksi rol oynar. DNA kırıklarının sayısal olarak artması γ H2AX ve 53BP1 ekspresyonun seviyesinin de artışına sebep olur. Bu nedenle, bu proteinler kanser hastalarında radyoterapinin sonucunu belirlemek için biyobelirteç olarak kullanılır. Örneğin, immünofloresan boyama ile γ H2AX gösterilmesi klinik olarak radyoterapi duyarlılığının tespitinde kullanılmıştır [124].

Radyobiolojiye göre, DSB onarım kapasitesine sahip olan hücreler radyasyona karşı daha dirençliken, onarım yeteneği zayıf olan hücreler daha hassas olarak bilinmektedir.

3. Hücre döngüsü kontrol noktaları: Hücre döngüsü G1, S, G2 ve M evrelerine ayrılır. Bu evreler siklin ve siklin kinazlar (CDK) tarafından düzenlenmektedir. DDR, hücre döngüsü kontrol noktalarının aktivasyonuna yol açar ve bu da DNA hasarının onarılması için daha fazla zaman sağlamak üzere hücrelerin döngü boyunca gecikmesine veya durmasına neden olur. HR kullanılarak çift zincir kırıklarının hatasız tamiri, S fazı sırasında kardeş kromatidin sentezlenmesini gerektirdiğinden hücre döngüsünün en radyosensitif fazı bu fazdır [136,137,138].

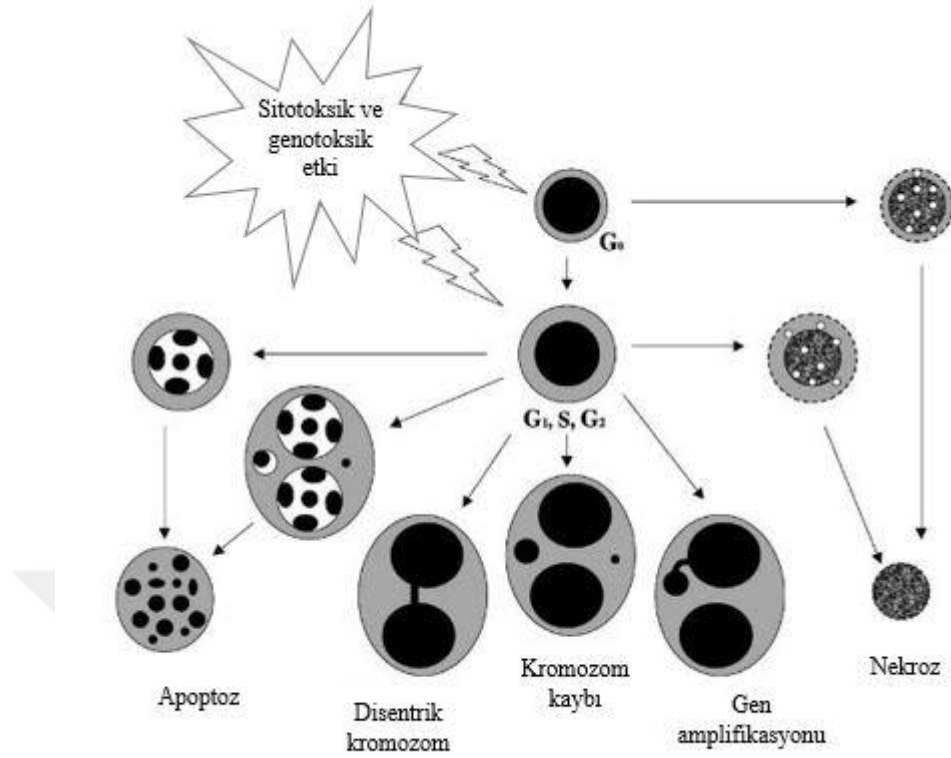
2.3 Mikronukleus

Mikronukleus (MN) bölünmekte olan hücrelerin anafazında geri kalan ve telofazda ana çekirdeğe dahil edilemeyen kromozomların ya da asentrik kromozom/kromatid parçalarının nukleus dışında kalmasıyla meydana gelen oluşumlardır. Nükleer zarla sarılmış ve sitoplazma içinde bulunan küçük çekirdek benzeri yapılar olarak görüntülenirler [139].



Şekil 2.3: Bir, iki ve daha çok MN'ye sahip binukleer hücreler [139].

Asentrik kromatid/kromozom parçalarını içeren MN, yanlış onarılmış veya onarılmamış DNA çift zincir kırıklarının sonucunda oluşur. Tüm kromatid/kromozomları içeren MN ise, satellit sentrometik/parasentrometik dizilerin hipometilasyonu, kinetokor defektleri ve anafaz kontrol noktasındaki genlerde olan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. MN sayısındaki artış, genotoksik ve kanserojen potansiyeli olan iyonlaştırıcı radyasyon, ilaç ve diğer kimyasallar dahil olmak üzere çeşitli ajanların neden olduğu hücrelerdeki sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin belirteci olarak değerlendirilmektedir [140,141].



Şekil 2.3.1: Sitotoksik ve Genotoksik ajanların hücre üzerinde etkileri [139].

Genomik kararsızlık kanserin başlaması ve ilerlemesinde tanımlayıcı özellik olarak bilinmektedir [142]. Bu kararsızlığın 3 tipi mevcuttur: bir veya birkaç nükleotidin baz değişimleri, delesyonlarıyla nitelenen DNA dizisi varyasyonlarından kaynaklanan nükleotid kararsızlığı (NIN); DNA tamir genlerindeki mutasyonlar sonucu kısa nükleotid tekrar dizilerinde meydana gelen değişimlerden kaynaklanan mikrosatellit kararsızlığı (MIN veya MSI) [143] ve kromozomal düzeyde yapısal ve sayısal düzensizliklerden kaynaklanan kromozomal kararsızlık (Chromosomal Instability; CIN). [144]. Hücre bölünmesi sırasında kromozom dağılımındaki hatalarla karakterize olan kromozom kararsızlığı kanser hücrelerinde yaygın olarak görülmektedir. Yapılan araştırmalar malin tümörlerin %60-%80'inde kromozom kararsızlığı olduğunu göstermiştir [144].

DSB, DNA lezyonlarının ölümcül şekli olarak değerlendirilmektedir [145]. DSB'ler kemoterapi, genotoksik kimyasallar ve radyasyon maruziyeti sonucunda oluşabilmektedir. Onarılmadığı takdirde bu lezyonlar kromozomal bozukluklara, mutasyonlara ve karsinogeneze neden olabilmektedir. Yüksek ökaryotik hücrelerde, DSB'lerin algılanmasında birkaç spesifik molekül bulunmaktadır [145]. Bu belirteçlerden biri γ H2AX oluşumunda rolü olan H2AX histonlarının Ser-139'da fosforilasyonu olarak bilinmektedir [146]. Bu fosforilasyon,

kromatinde DSB'lerin oluşumunu başlatan ve DNA hasarı onarımıyla ilişkili hücrel tepkilerden biridir. Diğer belirteç olan tümör baskılayıcı p53 bağlayıcı protein 1, insanlarda TP53BP1 geni tarafından kodlanan proteindir [147]. Radyasyona duyarlı 51 (RAD51) rekombinaz, DSB'nın tespitinde kullanılan diğer belirteçtir. RAD51, tek ve çift zincir DNA kırıklarının homolog rekombinasyon ile onarımında görev alır [148].

Kromozom kararsızlığı yapısal ve sayısal olarak sınıflandırılmaktadır [149]. Yapısal kromozom kararsızlığı kromozom bölgelerindeki artış, kayıplar veya yeniden düzenlenmeler (translokasyonlar, inversiyonlar) ile tanımlanır [149]. Anöploidi olarak da bilinen sayısal kromozom kararsızlığı ise bir kromozomun kaybı veya artışı olarak nitelendirilmektedir [150]. Kromozom kararsızlığına yol açan nedenler arasında, telomer disfonksiyonu, kromozom gecikmesi (anafaz lag), kromatin köprüleri, MN ve mitotik iğ hataları sayılabilir [151]. MN'lar, CIN-pozitif kanser hücrelerinde DNA hasarı nedeniyle oluşan kırık kromozom parçalarını ve anöploidileri gösteren biyobelirteçlerdir. MN'lar, akciğer [152], kolorektal [153], retinoblastoma [154], servikal kanserlerde [155] karsinogenezin belirteçi olarak bilinmektedir.

2.3.1. Mikronukleus Oluşum Nedenleri

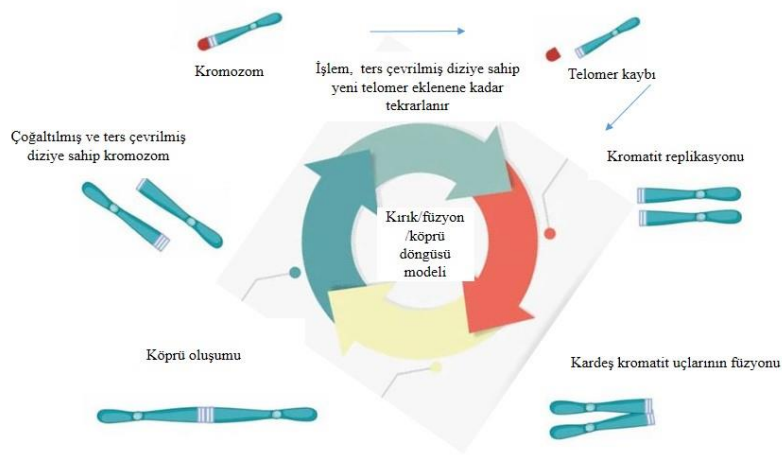
MN'lar mitozda geciken kromozomlar ve yavru hücrelerin nukleusuna entegre olamayan asentrik fragmentlerden oluşur.

Geciken kromozomlar ve hücre döngüsü senkronizasyonu: Geciken kromozomlar, kromozomların yanlış ayrılması, merotelik bağlanmanın sonucu oluşur. Yüksek CIN seviyelerine sahip kanser hücrelerinde sıklıkla gözlemlenir. Merotelik bağlanma, tek bir kinetokorun her iki kutuptan ayrılan mikrotübüllere bağlanması sonucunda gerçekleşmektedir. Bunun sonucu anafazda kromozomlar iki ayrı kutba çekilirken, merotelik bağlanan kromozom çekilemez ve arada kalır. Geciken kromozomlar sitokinez sonrası çoğunlukla nukleusa entegre olamaz ve mikronukleus oluşumu olarak gözlenir [156]. Geciken kromozomların çoğu anöploidiye sebep olmaz fakat ilgili yavru hücrede mikronukleus oluşumuna yol açar [157]. MN'ların nükleer zarfı kırılabilir ve kolayca bozulabildiği için, DNA'sı sitoplazmik bileşenlere maruz kalır [158]. S fazında nükleer zarfın etkilenmesi replikasyonun durmasına ve DNA hasarının oluşumuna neden olur [159]. MN'larda DNA replikasyonu sıklıkla gecikir ve sitokinez aşamasına kadar devam eder, bu da mikronukleus içinde bulunan DNA'nın yoğunlaşması ve parçalanmasıyla sonuçlanır. Parçalanma, sonraki yavru hücre

kromozomlarındaki yeniden düzenlenmelere yol açan nükleer entegrasyonu teşvik ederek DNA hasar seviyelerini artırmaktadır [160].

Asentrik fragmentler: Asentrik kromozom parçaları DNA replikasyonu ile ilgili olan onarılmamış DNA çift zincir kırıklarıyla ortaya çıkar. DNA replikasyonu ve tamirindeki bozukluklar, asentrik fragmentlere, dolayısıyla MN oluşumuna neden olur. Bu bozukluklar arasında ribonükleaz RNaseH2 [161,162], MCM2-7 [163] replikatif helikaz, DNA hasarına yanıtta aracı proteinler; MDC1 ve TOPB1 [164], DNA'ya yönelik primaz/polimeraz (PrimPol) [165], Fanconi anemisi/BRCA [163,166,167] yolunun bileşenleri, Bloom sendromu RecQ benzeri helikaz (BLM) [168], SMC5/6 [167] kompleksi, kromatin yeniden şekillendirme faktörleri SSX [169], ATRX [166] ve PARP1 ile etkileşimde olan protein KHDC3L [170] bulunmaktadır. Son olarak, kromozom içeren kromatin köprülerinin çözülmesi, asentrik parçaların oluşmasıyla sonuçlanarak her iki yavru hücrede MN oluşumunu sağlar.

Kromatin köprüleri: Kromozomların yanlış ayrılması anafaz kromozomlarının kromatin köprüsü oluşturduğu füzyonla da gerçekleşebilir. Bir kromatin köprüsü, nukleoplazmik/anafaz köprülerini ifade eden bölünmüş yavru çekirdekler arasındaki iki DNA molekülünü bağlayan kromatin dizisidir. S-fazı sırasında veya hemen sonrasında rekombinasyon veya replikasyon ara ürünlerinin uzaklaştırılmaması nedeniyle oluşmaktadır [171]. Sitokinezden önce kromatin köprülerinin çözülmemesi kanser hücrelerinde genomik kararsızlıkla sonuçlanır [172].



Şekil 2.3.1: Kırık/füzyon/köprü döngüsü modeli [173].

Kırık-füzyon-köprü modeli olarak adlandırılan bu mekanizmada (Şekil 2.3.1), kromozom kırıkları sonucu birleşmiş (transloke) kromozomlar anafazda ayrılamadan köprü olarak kalır ve telofaz sırasında kırılarak bir sonraki hücre döngüsü sırasında başka kırıklara ve uç birleşmelerine neden olur. Birbirini izleyen hücre bölünmeleri sırasında birden fazla kırılma ve füzyon döngüsünden sonra, genomda gen amplifikasyonu, anöploidi ve poliplodiye sebep olan yeniden düzenlemeler oluşabilir. Kromatin köprüleri, telomer yapısı veya uzunluğundaki kusurlar, DNA replikasyon hataları, kromozomlardaki translokasyonlar sonucu meydana gelebilir [173].

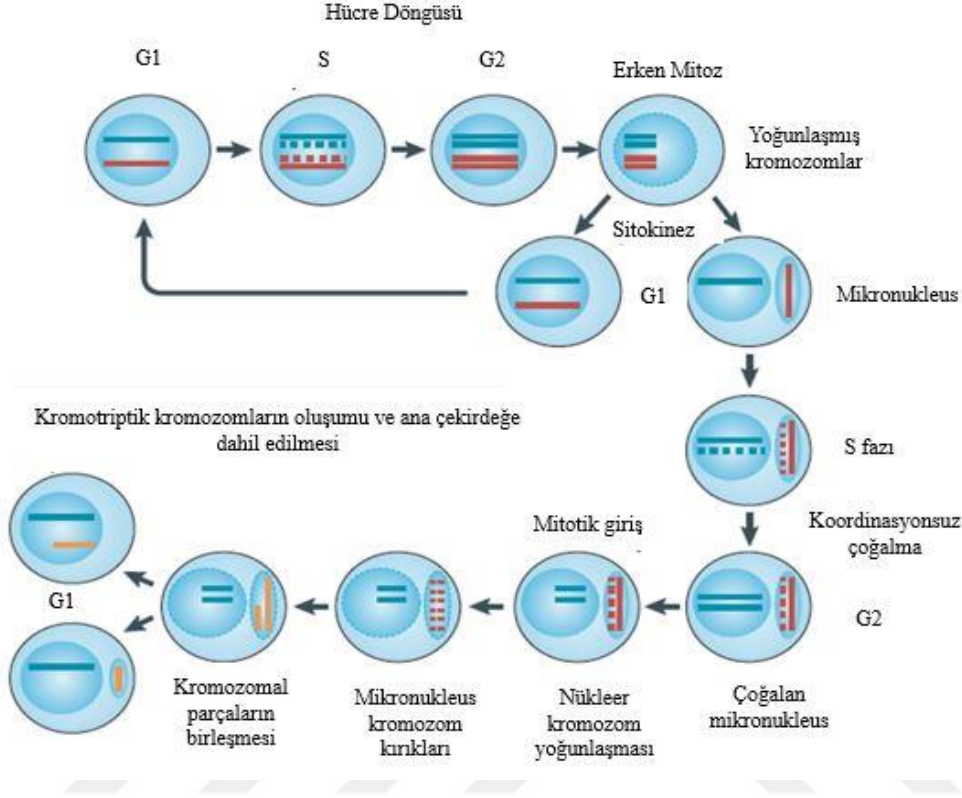
2.3.2 Mikronukleusun Yol Açtığı Sonuçlar

MN oluşumu ve onu takiben genom çapı yeniden düzenleme yapılarını incelemek için gerçekleştirilen çalışmada, mikronukleus oluşumundan sonra hücre siklusunun S ve G2 fazları arasında, kromozomal yeniden düzenlemelerin olduğu gözlemlenmiştir. MN'da nukleusa göre, daha fazla kromozom anomalileri ve kusurlu/asenkronik replikasyonlar saptanmıştır. MN içindeki kromatinin hala prematüre olarak kondanse olduğu gözlenmesi yüzünden, hücre bölünmelerinde MN'da bulunan hasarlı kromozom yapısı, primer nukleusa dahil olarak genoma entegre olabilmektedir [174].

MN, son yıllarda keşfedilen ve genellikle tek bir kromozom tamamı veya parçasında meydana gelen tek adımlı bir felaket olarak tanımlanan kromotripsis oluşumunda rol oynayan mekanizmalardan biri olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Yunanca chromo, renkli ve thripsis, parçalara ayrılmak anlamına gelmektedir. Kromotripsis, tek aşamalı hücresel bir felaket sonucu bir veya birden fazla kromozom bölgesinin lokalize olarak parçalanması, hatalı ve karışık sıralı bir şekilde yeniden birleşmesi şeklinde oluşmaktadır. Çok sayıda kromozom kırık noktası, kopya sayı değişimleri, yeniden düzenlenmeler genel özelliklerindedir [174].

MN ile bağlantılı DNA'nın parçalanma durumu ilk defa 1968 yılında Kato ve Sandberg tarafından rapor edilmiştir. MN'de bulunan genetik materyal, bozulmuş ve senkronize olmayan DNA replikasyonunun, nükleer zarfın bütünlüğünün bozulması ve nukleositol plazmik taşınmanın neden olduğu DNA tamirindeki hatalarla tanımlandığı kabul edilmiştir. Nükleusun aksine MN'ların nükleer por komplekslerinin olmadığı gösterilmiştir. Bununla bağlantılı olarak DNA onarımı ve replikasyonu için gerekli bileşenlerin MN'a teslimatı sekteye uğramakta ve bu sebeple MN içindeki mevcut hasar daha da artabilmektedir. Bu tip kromozom yapılarını

taşıyan MN, hücre tarafından elimine edilemezse MN, ilerleyen hücre döngülerinde, normal hücre çekirdeğine dahil olarak kromotriptik yapıların oluşmasına neden olabilir [175].



Şekil 2.3.2: Kromotripsis oluşum mekanizması olarak mikronukleus modeli. [174].

2.3.3 Mikronukleus İnceleme Yöntemleri

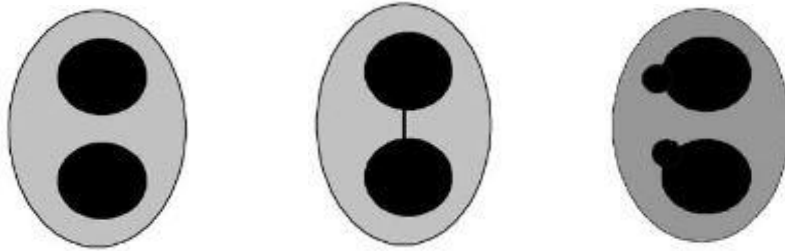
MN ilk kez, 19. yüzyılın sonunda Howell ve Jolly'nin kedi ve sıçanlardan alınan kanlarda yaptıkları araştırma sonucunda inklüzyonlar şeklinde bulunmuştur. Bu inklüzyonlar Howell-Jolly cisimciği olarak isimlendirilmiş ve ileri anemi hastalarından alınan perifer kan eritrositlerinde de gözlenmiştir. 1959 yılında Evans ve ark. tarafından yapılan çalışmada gama ışınlarının barbutuna kök uçlarında mikronukleus oluşturduğu gözlemlenmiş ve kromozom aberasyonu kantitatif olarak değerlendirilmiştir [176]. 1970 yılında Boller ve Schmid, Çin Hamsterinin kemik iliği ve perifer kanını alkilleyici ajan olan trenimon ile muamele ederek hematopoez sırasında çekirdeklerden yoksun normal eritrositler arasında mikronukleuslu eritrositlerin sıklığını değerlendirmek amacıyla test yöntemi geliştirmişlerdir [177]. Makalede bu yöntem "Mikrokern-Testi" (mikronukleus testi) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraki yıllarda MN ile ilgili farklı çalışmalar yapılmaya devam etmiştir. Ancak, kromozom anomalilerinin MN olarak gösterilebilmesi nükleer bölünmeyi gerektirdiğinden ve kullanılan yöntemlerde hücrenin bölünüp bölünmediği ayırt edilmediğinden güvenilir sonuçlar elde

edilememiştir. MN 1985’de Fenech ve Morley tarafından sitokinezin engellenmesi esasına dayanan ve hücre döngüsünü tamamlayan çift nukleuslu (binukleer) hücrelerin elde edilmesini sağlayan bir yöntemin geliştirilmesi daha güvenilir ve kabul gören çalışmalara imkan sağlamıştır [141].

Sitokinez bloğu mikotoksin metaboliti olan sitokalasin-B (cyt-B) kullanımıyla elde edilmektedir. Spesifik olarak, cyt-B mikrofilament halka oluşumunda rolü olan aktin polimerizasyonunu inhibe ederek sitoplazmanın bölünmesini engeller. Bölünen hücrelerin iki nukleuslu aşamasında cyt-B ile inhibe edilmesi, sitokinezde kromatin köprülerinin çözülmesini sağlayabilmek için bir süre sağlamaktadır. Ayrıca, sitokinez inhibisyonu kromatin köprülerinin kırılmasını önleyerek bunların daha sonraki analizler için iki nukleuslu hücrelerde birikmesini sağlamaktadır [178].

CBMN testinde sitotoksik etki tek, çift ve çok nukleuslu hücrelerden ilave nekrotik ve apoptotik hücre oranlarının kaydedilmesiyle hesaplanmaktadır [178]. MN oluşumunda rolü olan mekanizmaların belirlenmesinde CBMN yöntemiyle kinetokorların immünokimyasal işaretlenmesi veya sentromerik/telomerik problemlerle in situ hibridizasyon birlikte kullanılabilir. Bu deneylerin birlikte kullanılması, MN’lerin içeriğindeki kromozomlar veya asentrik parçaların tanımlanmasını da sağlayabilmektedir. 1997 yılında 21 ülkeden 34 laboratuvarın katılımıyla gerçekleştirilen ortak projede (HUMAN Micronucleus (HUMN) Project), CBMN yöntemi ile insan popülasyonunda MN sıklığı çalışılmış ve kanserde önemli biyobelirteç olarak kabul edilmiştir [179].

CBMN testi DNA hasarı, nekroz, apoptoz, sitostaz ve sitotoksisiteyi ölçmek için kullanılmaktadır. Önceden lenfositlerin analizi için geliştirilmiş CBMN testi epitelyal ve mezenkimal hücrelerde de MN değerlendirmek için kullanılabilir [178]. CBMN testi, MN’lara ek olarak nukleoplazmik köprüler (NPB), nukleer tomurcuklar (NBUD), bölünen hücre oranı (sitostaz parametresi, NDi), apoptoz ve nekroz geçiren hücrelerin (sitotoksisite) değerlendirilmesinde önemli role sahiptir (Şekil 2.3.3)



Şekil 2.3.3: BN, NPB ve NBUD [139].

NPB'ler yavru nukleuslar arasındaki dar köprüler olarak bilinmektedir ve DNA çift zincir kırıkları veya DNA yanlış onarımı sonrası telomer uç füzyonlarından kaynaklanan disentrik kromozom belirticidir. NPB'ler disentrik kromozom/kromatidlerin sentromerleri anafaz sırasında mitotik iğın zıt kutuplarına çekilmesi sonucunda oluşmaktadır (kırık-füzyon-köprü). NBUD'lar ise gen amplifikasyonunun belirtici olarak kabul edilmektedir. Nukleoplazmik bağlantı aracılığıyla çekirdeğe bağlanan mikronukleus benzeri oluşumlardır, hücrelerin fazla (amplifiye olmuş) DNA'yı uzaklaştırdığı mekanizmayı göstermektedir [178].

CBMN yönteminde hücrelerin skorlanması Fenech'in [178] getirdiği kriterlere göre yapılmaktadır. Sitokinezi engellenmiş hücreler MN sıklığı için aşağıdaki özellikleri taşımalıdır:

1. Hücreler çift çekirdeğe sahip olmalıdır.
2. Çift çekirdekli hücreler sağlam nükleer membrana sahip olmalı, aynı sitoplazmik sınır içinde yer almaları gerekmektedir.
3. Çift çekirdekli hücrelerdeki iki çekirdek eşit büyüklük, boyama deseni ve boyama yoğunluğuna sahip olmalıdır.
4. Çift çekirdekli hücrelerdeki iki çekirdek nükleer çapın dörtte birinden fazla olmayan ince nukleoplazmik köprü ile bağlanabilmektedir.
5. Çift çekirdekli hücrelerdeki iki ana çekirdek bir birine dokunabilir ancak terch edilen birbiriyle çakışmamalıdır. Çakıştığı halde nükleer sınırın ayırt edilirse değerlendirilebilir.
6. İki çekirdekli hücrenin sitoplazmik sınırı veya membranı bütün olmalı ve komşu hücrenin sitoplazmik sınırından ayırdedilmelidir.

MN skora kriterleri: Morfolojik olarak ana çekirdeklerle aynı olsa da, ölçü olarak daha küçük boyutlara sahiptir.

1. İnsan lenfositlerindeki MN çapı ana çekirdeklerin ortalama çapının 1/16'sı ile 1/3'ü arasında değişerek BN hücresindeki ana çekirdeklerden birinin alanının 1/256'sı ile 1/9'una karşılık gelir.
2. MN yuvarlak veya oval şekilde olabilir.
3. MN refraktil değildir, boyama partikülleri gibi artefaktlardan kolaylıkla ayırt edilebilir.
4. MN ana çekirdeğe bağlı değildir.

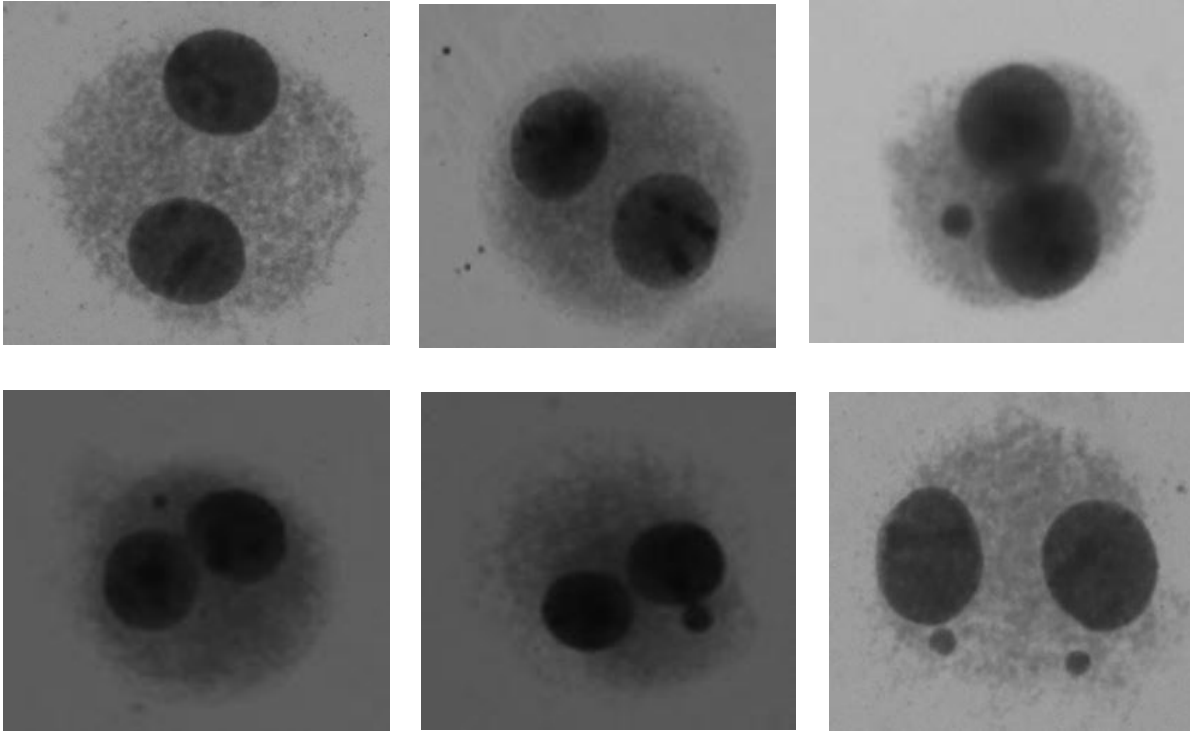
5. MN ana çekirdeklerle üst üste gelmemeli, mikronükleer sınır nükleer sınırdan ayırt edilebilir nitelikte olmalıdır.
6. MN genellikle ana çekirdeklerle aynı boyanma yoğunluğuna sahip olsa da, bazen boyanmanın daha yoğun olabilme ihtimali vardır.

NPB'ler için skorlama kriterleri:

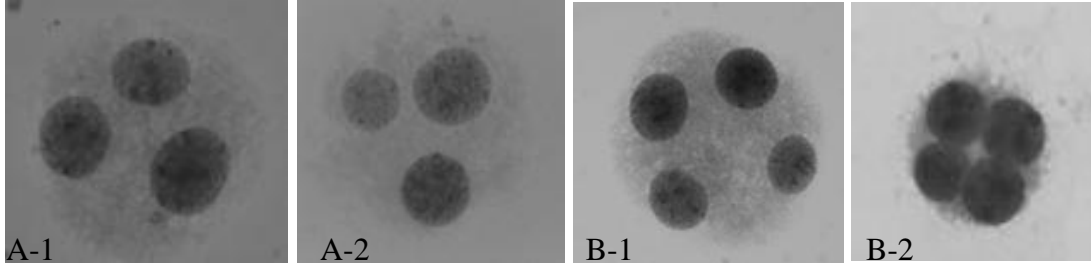
1. Çift çekirdekli hücreler arasında nükleoplazmik bağlantı şeklinde görünmektedir.
2. NPB'lerin çapı değişken karaktere sahiptir ancak genellikle hücre içindeki çekirdek çaplarının $\frac{1}{4}$ 'ini geçmemektedir.
3. NPB ana çekirdeklerle aynı boyanma özelliğine sahip olması gerekmektedir.
4. Nadiren birden fazla nükleoplazmik köprü bir binükleer hücre içinde gözlemlenebilir.
5. Nükleoplazmik köprüye sahip çift çekirdekli hücre bir veya daha fazla MN içerebilir veya içermeyebilir.

Nükleer tomurcuklar için skorlama kriterleri:

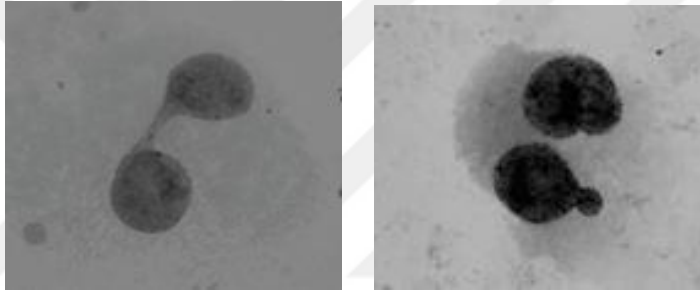
1. NBUD ekstrüzyon sürecinin aşamasına bağlı tomurcuk çapından daha dar veya ince köprü ile çekirdeğe bağlanmaları dışında görünüş olarak MN'lere benzemektedir.
2. NBUD MN ile aynı boyanma özelliğine sahiptir.
3. Çekirdeğe bileşik vakuol içerisinde yer alır gibi görünmektedir.



Şekil 2.3.3.1: A 1-2 BN hücre, B-B1-B2 bir mikronukleuslu BN hücre, C- iki mikronukleuslu BN hücre



Şekil 2.3.3.2: A 1-2 3N ve B 1-2 4N hücelere örnekler



Şekil 2.3.3.3 . NPB ve NBUD hücrelerine örnekler

2.3.4 Mikronukleus Testi Kullanım Alanları

MN 1980'den sonra deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda kimyasal ve fiziksel ajan maruziyeti sonucunda oluşan sitotoksik hasar göstergesi olarak kullanılmıştır. MN testi, kromozomların etkileyen ultraviyole ve radyasyon gibi fiziksel etkenlerin, kimyasal maddelerin genotoksik ve karsinojenik etkisinin tespitinde, ilaçların toksik etkilerinin araştırılmasında, kromozom kararsızlığının gösterilmesinde biyobelirteç olarak kabul edilmektedir [180]. Kullanım alanlarından biri de kanser genetiğidir. Bu yöntemle, hücrelerdeki kromozom kırıkları, premalin değişiklikler, hücrelerde oluşan morfolojik değişiklikler kansere işaret ettiğinden kanser riskinin gösterilmesinde kullanılabilir [181]. Ayrıca, tedavi sırasında hastalığın ilerlemesiyle oluşan ikincil kromozomal değişikliklerin tespitinde kullanılmaktadır. İyonize radyasyonun ve mikrodalga ışınlarının klastojenik etkisini gösterme yeteneğine sahiptir.

MN yöntemi, sigara, pestisitler, ve bu gibi diğer kimyasal maddeler, enfeksiyon gibi çevresel ve mesleki maruziyet sonucu oluşan etkilerin değerlendirilmesinde uygulanmaktadır [182].



2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

BBK’i baş ve boynun mukozal yüzeylerini (örn. ağız, boğaz, larenks) çevreleyen yassı hücreleri tutan tümörlerdir ve baş boyun yassı hücreli karsinomları olarak isimlendirilir. Ayrıca, tükürük bezlerinde, sinüslerde, baş ve boyundaki kas veya sinirlerde de meydana gelebilir. Ancak bu kanser türleri yassı hücreli karsinomlardan daha az yaygın olarak bilinmektedir [183,184]. Yılda 660.000’den fazla yeni vaka ve 350.000 ölümle dünya genelinde yaygın kanserlerden biridir [185,186]. Özellikle, gelişmiş ülkelerde sigara kullanımının azalması sebebiyle etiyojide olası değişiklikler görülmekle birlikte, görülme sıklığında artış gözlemlenmektedir [187]. BBK’nin görülme sıklığı için 2030 yılına kadar yıllık %30’luk bir artışın olacağı öngörülmektedir. BBK hem hastalık hem de tedavi sürecinde hastaların temel işlevlerinde bozukluklara sebep olarak yaşam kalitelerini etkileyen kanser türüdür. BBK’de görülebilecek klinik bulgular, primer bölge, kanser oluşumunda rolü olan risk faktörlerine maruz kalmaya göre değişkenlik gösterir. BBK’nin klinik tanısı, hastanın fizik muayenesi, tıbbi öyküsü, radyolojik ve tümör doku örneklerinin patolojik incelenmesiyle yapılmaktadır. Genel olarak, BBK erkekleri kadınlardan 2-4 kat daha fazla etkilemektedir [188]. Erkeklerde oral kavite ve dudak kanserleri ikinci yaygın kanserler olarak bilinmektedir (100.000’de 10) [189]. Tütün içme ve alkol kullanımı BBK için önemli risk faktörlerindedir ve vakaların %72’sinde tütün ve alkolün birlikte kullanıldığı gözlenmektedir [190], Fiziksel aktivite [191], ağız hijyeni [192], diyet [193], ve diğer yaşam tarzı faktörleri kısmen minör risk faktörleri arasındadır. Yüksek riskli HPV (özellikle HPV tip 16), orofarenks kanserleri için önemli risk faktörüdür [194]. BBK için risk faktörlerinden biri genetik faktörlerdir ve genetik yatkınlıkla ilişkili çalışmalar oral ve farenks kanserlerinde yapılmıştır [195].

Tedavi yöntemleri tümörün evresine göre değişiklik göstermektedir. Erken evre BBK hastaları için genel tedaviler cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immunoterapi, gen tedavisi vb. içermektedir [196]. İleri evre BBK hastaları için ise kemoterapi ve kemo-radyoterapi kombine tedavisi dahil olmak üzere multidisipliner tedavilerin kullanılması önem taşımaktadır [197]. Son 20 yılda, RT sağlıklı komşu dokulara verilen dozu azaltarak risk altında olan primer bölgeyi ve lenf nodu bölgelerini hedef alarak, gelişebilecek akut ve kronik yan etkilerin oluşmasını azaltarak tedavi oranını artırmıştır ve günümüzde BBK hastaları için yaygın kullanılan tedavi

bir yöntemidir [198]. RT'nin sonucunu kontrol eden temel faktörlerden biri radyasyon dozudur. Radyasyon, canlılarda moleküler ve hücresel düzeyde değişikliklere neden olmaktadır [199]. Standart RT için genellikle günde 2 Gy fraksiyonlar halinde, haftada 5 gün, toplam 60-70 Gy verilmektedir [200]. Yüksek voltajlı X-ışını dokulara nüfuz ettiğinde oksijeni iyonize eder ve serbest oksijen radikallerini (ROS) üretir, bu da hücrelerin genetik materyaline (DNA) zarar verir ve hücre bölünmesinin ve çoğalmasının engellenmesiyle sonuçlanır. Kanser hücreleri genellikle hipoksiktir ve radyasyon tedavisine nispeten dirençlidir. Ancak, radyoterapinin anti-tümör etkisi radyasyon bölgesinde yer alan normal dokularda da hasara neden olmaktadır. [201]. RT sonrası toksisite, radyasyon sonrası ortaya çıkan komplikasyonlar olarak tanımlanmaktadır ve bunlar normal dokularda geçici veya kalıcı değişikliklere neden olabilir. Yaygın akut toksisiteler arasında mukozit, dermatit, disfaji, odinofaji, ses kısıklığı, larenks ödemi ve tat kaybı gibi etkiler bulunmaktadır [202]. Geç toksisitelere ise osteoradionekroz, kserostomi, subkutan fibroz, tiroid disfonksiyonu, trismus vb. örnek verilebilir [203]. Radyosensitivite, bunlar gibi olumsuz yanıt oranına yol açan belirleyici faktör olarak bilinmektedir [204]. Radyosensitiviteyi yansıtan biyobelirteçlerin tanımlanması tedavi kişiselleştirilmesinde, toksisiteyi sınırlamada temel stratejiler olarak kabul edilmekte ve farklı yöntemlerle gösterilmektedir [205]. Bu yöntemlerden biri CBMN yöntemidir. Genotoksik ajan maruziyeti sonrası DNA hasarı ve kromozom parçaları oluşmaktadır. Sentromeri olmayan parçalanmış kromozomlar, sitokinezde her bir yavru hücreye bir çift homolog kromozomu ayıran kinetokora bağlanamaz ve nukleus dışında kalarak mikronukleus oluşumuna neden olur. Aktin inhibitörü olan sitokalasin kullanılarak, iki yavru hücrenin nukleus bölünmesi devam ederken sitokinezinin tamamlanması engellenir, bu da iki yavru çekirdeğe sahip bir hücre, yani çift çekirdekli hücrelerin oluşmasına yol açar. Bu iki çekirdekli (binukleer) hücrelerde nukleusa katılamayan kromozom parçaları küçük nukleus görünümünde, mikronukleus adı verilen yapılar olarak izlenir ve mikroskopta analiz edilerek kromozom hasarının saptanması sağlanır [206]. CBMN yöntemi, perifer kanında toplam MN, NPB, NBUD sayısını belirlemek için kullanılmıştır.

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında tedavisi uygulanan 10 KRT, 12 RT hasta perifer kanları kullanılmıştır. Ayrıca, kontrol grubuna 10 sağlıklı birey dahil edilmiştir ve perifer kanları alınmıştır. Alınan 10 ml kanların, biri tüp içinde ışınlanarak (2 Gy) diğeri ışınlanmadan çalışılmış ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Asım Cenani Sitogenetik Laboratuvarında CBMN yöntemi uygulanmıştır. Hasta grupları arasındaki

radjosensitiviteye göre bireysel farklılıklar ve tedavi sırasında lenfositlerde oluşan kromozomal hasarı incelemek ve bu hasarın RT ve KRT tedavi yöntemlerine göre farklılık gösterip göstermediği araştırılmıştır. Her hasta için planlanmış hücre oranı sayılarak, MN sıklığı araştırılmıştır, tedavi aşamalarına göre hasta grupları ve kontrol grubu karşılaştırılmalı olarak iki ayrı tedavi grubundaki hastaların klinik bulguları ve radyotoksisiteleri karşılaştırmalı olarak değerlendirmeye alınmıştır.



2. YÖNTEM

2.1. Olgular

Çalışmaya, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında BBK tanısıyla RT uygulanan 12 ve KRT uygulanan 10, toplam 22 hasta dahil edildi. Kontrol grubu olarak ise, herhangi bir kanser öyküsü olmayan ve sigara içmeyen 50 yaş üstü 10 sağlıklı birey seçildi. Çalışma, 21 Haziran 2022 tarihinde İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Sayı: E-83045809-604.01.01-416043) ve çalışmaya dahil olan hasta ve kontrol grubunu oluşturan olgulardan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

2.1.1. Tedavi

RT uygulanan grupta, 7 olguya cerrahi sonrası, 5 olguya cerrahi olmaksızın sadece RT uygulandı. KRT uygulanan grupta 8 olgu kemoterapi (KT) ve RT'yi eş zamanlı olarak alırken, 2 olguda önce KT, ardından RT uygulandı. Endikasyonu olan 2 hastaya RT öncesi neoadjuvan 3 kür dosetaksel-sisplatin-5 FU kemoterapisi, ardından RT ile eş zamanlı haftalık 40 mg/m² uygulanmış, 8 hasta ise üç haftada bir 100 mg/m² sisplatin kemoterapisi almıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin *Ex Vivo* Işınlanması

Hastalardan, tedavi öncesi, tedavi ortası ve tedavi sonunda 10 ml heparinli kan alındı. Aynı miktarda heparinli kan kontrol grubuna dahil bireylerden de toplandı. Kan örneklerinin toplanma zamanlaması Şekil 2.2.1'deki çizelgede gösterilmektedir. İki ayrı tüpte alınan kan örneklerinden biri pirinç dolu kutu içine yerleştirilerek Radyasyon Onkolojisi Anabilim dalında oda sıcaklığında 2 Gy X-ışını ile ışınlandı. Pirinç dolu kutu içinde ışınlamanın sebebi insan dokusuna daha yakın ışın almasıyla ilişkilidir. Diğer tüp ışınlanmadan çalışıldı.

2.1.2.2 Kültür Çıkışı

1. Tüpler etüvden alınarak 1200 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiştir.
2. Bu sürenin sonunda supernatant atılarak pellet üzerine vorteks üzerinde 4 tüpe 6 ml soğuk 0.075M KCl eklenerek hipotonik şok için, 1200 rpm'de 8 dak santrifüjlenmiştir.
3. Hipotonik şok süresinin sonunda tüpler santrifüjden alınarak, supernatant atılıp pellet üzerine vorteks üzerinde 5:4:1 oranında taze hazırlanmış ve soğuk olan NaCl:Metanol:Asetik Asit fiksatifinden damlatılarak ilave edilmiştir. Tekrar 1200 rpm'de 8 dak santrifüjlenmiştir.
4. Santrifüj bitiminde supernatant atılıp pellet üzerine vorteks üzerinde 4:1 oranında taze hazırlanmış ve soğuk olan Metanol:Asetik Asit fiksatifinden damlatılarak ilave edilmiştir. Bu işlem 2 kez daha yapıldıktan sonra yayma işlemine hazırlanmıştır.

2.1.2.3 Yayma İşlemi

1. Santrifüj edilmiş ve supernatantı atılmış 4 tüpteki pellet %70-75 nem oranında lam üzerine mikropipet yardımıyla 60µl örnek yayılmıştır.
2. Lamlar boyama işleminin gerçekleştirilmesi için havada kurutulmaya bırakılmıştır.

2.1.2.4. Boyama İşlemi

1. 1 buffer tablet, 1litre içeren buffer solüsyonu hazırlanmıştır.
2. Boyama için hazır hale gele gelen lamlar 10ml Giemsa boya + 90 ml buffer solüsyonundan ibaret boyada 10 dakika bekletilerek boyanmıştır.
3. Süre bitiminde lamlar akan suda yıkanarak havada kurumaya bırakılmıştır.

2.1.2.5 Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan preparatlar, Olympus BX50, Leica DM 2500 ışık mikroskopunda x10 objektifle taranarak incelenmiş ve görüntüler Argenit AKAS kromozom analiz ve görüntüleme sisteminde arşivlenmiştir. Her hasta ve sağlıklı birey için toplam 1000 hücre sayılması hedeflenmiş ve hücreler FENECH [178] kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

2.3. İstatistik Analiz Yöntemleri

RT, KRT olgu gruplarının tedavi öncesi ışınlı ve ışısız MN sıklıkları, ND indeksleri ile kontrol grubu MN sıklıkları, ND indeksleri arasındaki ilişki tek yönlü varyans analizi ANOVA yöntemi

ile değerlendirildi. RT ve KRT olgu gruplarının ışıklı ve ışısız çalışılmasına göre MN sıklıkları ve ND indeksleri Paired Samples T-testi ile değerlendirildi. RT ve KRT olgu gruplarında tedavi zamanlamasına göre MN sıklıkları, ND indeksleri Repeated Measures ANOVA testi ile değerlendirildi. RT ve KRT olgu gruplarındaki ışıklı ve ışısız MN sıklıkları ile oluşan yan etkiler arasındaki ilişki Pearson ve Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. RT ve KRT olgu gruplarındaki ışıklı ve ışısız MN sıklık farkları ile yan etkiler arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi uygulanarak değerlendirildi. RT ve KRT olgu gruplarındaki yaş, cinsiyet, aktif sigara ve sigara kullanımı, RT fraksiyon sayısı, evre T ve N dağılımları ile ışıklı ve ışısız MN sıklıkları arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi.

2.4 Nükleer Divisyon İndeksinin hesaplanması

Nükleer Divisyon İndeksi (NDi) canlı hücrelerin bölünme kapasitesini gösterir ve sitotaksik etki göstergesi olarak bilinmektedir. NDi Eastmond ve Tucker'in [208] yöntemine göre hesaplanmaktadır. 1,2,3,4 çekirdekli hücrelerin sıklığının belirlenmesinde 500 hücre sayılmış ve $NDi = (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4)/N$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Burada, M1- M4 1-4 ekirdekli hücre sayısını, N ise toplam hücre sayısını gösterir (nekrotik ve apoptotik hücreler hariç). Mümkün olan en düşük NDi değeri 1,0 olarak kabul edilmektedir. Bu değer, tüm hücrelerin sitokinez bloğu döneminde blnememesi, ve hepsinin tek çekirdekli olması durumunda ortaya çıkmaktadır. Tüm canlı hücreler bir nükleer bölünmeyi tamamladıysa, ve bu nedenle hepsi iki ekirdekliyse, NDi değeri 2,0'dır. Bir NDi değeri ancak canlı hücrelerin önemli bir kısmı sitokinez-blok fazı sırasında birden fazla nükleer bölünmeyi tamamlamışsa ve bu nedenle ikiden fazla çekirdek içeriyorsa, NDi değeri 2,0'den büyük olabilir.

2.5 Kullanılan kimyasallar ve cihazlar

2.5.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1. Derin Dondurucu (-20 C) (4042 T Plus)
2. Buzdolabı (4042 T Plus +4°C)
3. Etüv (Memmert BM400)
4. Manyetik Karıştırıcı (Are Velp Scientifica)
5. Vorteks (SCIOLOGEX MX-S)

6. Hassas Terazî (Precisa x B 220 A)
7. Mikropipet (Gilson (100-100µl), Discovery Comport (100-1000µl))
8. Pastör pipeti
9. Santrifüj (Hettich Rotafix 32A)
10. pH metre (İsolab)
11. Pipet Uçları
12. Eldiven (BRP)
13. Mikroskop (Leica DM 2500) (Olympus BX50)

2.5.2 CBMN Yönteminde Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. NaCl (Biobasic Canada)
2. KCl (Tekkim)
3. Sodium Pyruvate (Diagnovum)
4. Penicillin/Streptomycin (Diagnovum)
5. Asetik Asit (Tekkim)
6. Metanol (Tekkim)
7. FBS (Fetal Bovine Serum) (Diagnovum)
8. Phytohemagglutinin (Diagnovum)
9. RPMI 1640, with L-glutamine (Diagnovum)
10. Cytochalasin B (Cayman Chemical)
11. Giemsa Stain Boya (Zag)
12. Ksilen (İzomerleri Karışımı) (Tekkim)
13. Entellan (Molekula)
14. Buffer Tablet (Merck)

15. DMSO (Sigma)

2.5.3 CBMN yönteminde Kullanılan Çözeltiler

3.3.1.1. Besi Ortamı

90 ml RPMI 1640, L glutamine

20 ml Fetal Bovine Serum

1 ml Penicillin/Streptomycin

1 ml Phytohemagglutinin

1 ml Sodium Piruvat

Elde edilen karışım 12 ml'lik hücre kültürü tüplerine 5'er ml bölünerek kullanım solüsyonu hazırlanır.

Sitokalsin-B çözeltisi

5 mg sitokalsin-B ve 8,35 ml DMSO'da karıştırılarak stok solüsyon elde edilir. 8,35 ml stok 75,15 ml RPMI 1640, with L-glutamine ile sulandırılarak kullanım solüsyonu elde edilir. 600 µg/ml olacak şekilde bölünür.

Giemsa boyası

1 buffer tablet pH 6.8

1 lt distile su

Manyetik karıştırıcıda buffer tablet 1 lt distile suda çözelti olarak buffer solüsyonu hazırlanır.(pH 6-7)

90 ml buffer solüsyonu

10 ml Giemsa boyadan oluşan %1'lik giemsa çözeltisi hazırlanır

2.5.4 Kültür Çıkışında Kullanılan Solüsyonlar

0,075 M KCL Hipotonik Şok solüsyonu hazırlanır.

2.5.4.1 Yıkama Fiksatif 1.

50 ml NaCl

40 ml Metanol

10 ml Asetik asit

2.5.4.2 Yıkama Fiksatif 2.

40 ml Metanol

10 ml Asetik Asit

2.5.5 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

NaCl (Biobasic Canada)

KCl (Tekkim)

Sodium Pyruvate (Diagnovum)

Penicillin/Streptomycin (Diagnovum)

Asetik Asit (Tekkim)

Metanol (Tekkim)

FBS (Fetal Bovine Serum) (Diagnovum)

Phytohemagglutinin (Diagnovum)

RPMI 1640, with L-glutamine (Diagnovum)

Cytochalasin B (Cayman Chemical)

Giemsa Stain Boya (Zag)

Ksilen (İzomerleri Karışımı) (Tekkim)

Entellan (Molekula)

Buffer Tablet (Merck)

3. BULGULAR

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında RT (n=12) ve KRT (n=10) uygulanan 22 BBK tanılı hasta dahil edilmiştir. RT uygulanan hastaların cinsiyet dağılımı 10 erkek, 2 kadın; KRT uygulanan hastaların cinsiyet dağılımı 9 erkek 1 kadın şeklinde olmuş, kontrol grubuna ise 7 erkek, 3 kadın dahil edilmiştir. RT uygulanan hasta grubunun ortanca yaşı 62,5 (36-75), KRT uygulanan hasta grubunun 66 (47-72), kontrol grubunun ise 56 (50-59)'dır. RT olgu grubu 6 larenks, 1 sinonazal tümör, 5 oral kavite, KRT uygulanan olgu grubu 3 orofarenks, 2 nazofarenks, bir larenks, bir oral kavite, bir hipofarenks, bir özofagus ve bir primeri bilinmeyen boyun metastazı tanısına sahip bireylerden oluşmuştur. RT olgu grubu için 16-33, KRT olgu grubu için 33 tedavi fraksiyonu uygulanmıştır. RT olgu grubuna, tedavi öncesinde sigara kullanan 10, kullanmayan 2 hasta, KRT olgu grubunda ise sigara kullanan 7, kullanmayan 3 hasta dahilmiştir. Tedavi sırasında ve sonrasında RT olgu grubuna ait hastalardan sigara kullanan 10 hastanın 8'i, KRT olgu grubuna ait 7 hastanın da 5'i sigara kullanımını bırakmıştır. Kontrol grubu, sigara kullanmayan, kanser öyküsü ve başka herhangi bir sağlık sorununa sahip olmayan bireylerden oluşmuştur. RT ve KRT olgu gruplarının klinik bilgileri Tablo 3.1 ve 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.1: RT Uygulanan Olgu Grubunun Cinsiyet, Yaş, Sigara Kullanımı ve TNM evreleri.

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Sigara	Aktif sigara	Fraksiyon sayısı	Tanı	Evre
RT1	E	60	+	-	16	Larenks	TisN0
RT2	E	71	+	-	25	Larenks	T1N0
RT3	E	63	+	+	28	Larenks	T1N0
RT4	E	75	+	-	30	Larenks	T3N0
RT5	E	70	+	-	25	Oral kavite	T3N2

RT6	K	44	-	-	30	Oral kavite	T4N0
RT7	E	54	+	-	30	Sinonazal tümör	T3N0
RT8	E	36	-	-	30	Oral kavite	T3N2
RT9	E	69	+	+	30	Oral kavite	T1N0
RT10	E	70	+	-	33	Larenks	T2N0
RT11	K	43	+	-	33	Oral kavite	T3N1
RT12	E	60	+	-	33	Larenks	T4N1

.* Bilgiler hastanın takip edildiği klinikten temin edilmiştir.

Tablo 3.2: KRT Uygulanan Olgu Grubunun Cinsiyet, Yaş, Sigara Kullanımı ve TNM evreleri.

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Sigara	Aktif sigara	Fraksiyon sayısı	Tanı	Evre
KRT1	E	67	+	-	33	Larenks	T3N0
KRT2	K	60	+	+	33	Oral kavite	T3N2
KRT3	E	66	-	-	33	Primeri bilinmeyen boyun metastazı	TxN3
KRT4	E	52	+	-	33	Orofarenks	T2N3
KRT5	E	69	+	-	33	Orofarenks	T1N1
KRT6	E	67	-	-	33	Orofarenks	T3N2
KRT7	E	47	+	+	33	Nazofarenks	T4N2

KRT8	E	66	+	-	33	Nazofarenks	T4N1
KRT9	E	63	-	-	33	Hipofarenks	T3N1
KRT10	E	72	+	-	33	Özofagus	T4N1

Tablo 3.3: Kontrol Grubunun Cinsiyet ve Yaş dağılımları.

Olgu	Cinsiyet	Yaş
1	K	51
2	K	58
3	E	57
4	E	53
5	E	57
6	E	55
7	E	59
8	E	57
9	K	54
10	E	50

RT uygulanan 10 hastadan tedavi öncesi, tedavi ortası ve tedavi sonu perifer kanları alınmış, 2 hastadan, tedavi sonunda sağlık sorunları olması nedeniyle sadece tedavi öncesi ve ortasında kan alınabilmektedir. KRT uygulanan 10 hastanın 8'inden tedavi öncesi, tedavi ortası ve tedavi sonu kanları alınmıştır. Bir hasta sağlık sorunu, bir hasta da ex olduğundan tedavi sonunda kanları alınamamıştır. Kontrol grubuna dahil olan bireylerden bir kez 10 ml perifer kanı alınmış, ışıklı ve ışısız olarak çalışılmıştır.

RT grubuna ait 12 hastadan tedavi öncesinde ışınlanarak çalışılan kan örneklerinden hazırlanan preparatlar için 802-1503 hücre; ışsız kan örneklerinde 890-1524 hücre sayılmıştır. Tedavi ortasında çalışılan ışınlı kan örneklerinde 690-1501 hücre, ışsız kan örneklerinde 765-1093 hücre sayılmıştır. Tedavi sonunda çalışılan ışınlı kan örneklerinde 753-1083 hücre, ışsız kan örneklerinde 588-1547 hücre sayılmıştır, 2 hastadan sağlık sorunlarından kaynaklı tedavi sonu kanları alınamadığı için çalışılmamıştır.

KRT grubuna ait 10 hastadan tedavi öncesinde ışınlanarak çalışılan kan örneklerinden hazırlanan preparatlar için 412-1022 hücre, ışsız kan örneklerinde 335-1000 hücre sayılmıştır. Tedavi ortası için ışınlı kan örneklerinde 885-1022, ışsız kan örneklerinde 930-1064 hücre, Tedavi sonu için ışınlı kan örneklerinde 524-1054 hücre, ışsız 384-960 hücre sayılmıştır. 2 hastadan tedavi sonu kanları alınamadığı için çalışılmamıştır.

Her olgu grubu için, tedavi öncesi, tedavi ortası ve tedavi sonu için sayılan hücrelerde MN sıklık (%) hesaplanmıştır (Tablo 3.4). NPB, NBUD gözlenen hücrelerin oranı çok düşük olduğundan MN sayımı olarak alınmıştır.

Tablo 3.4: RT ve KRT hastalarının MN sıklıkları (%).

Olgu	Tedavi öncesi ışsız MN	Tedavi öncesi ışınlı MN	Tedavi ortası ışsız MN	Tedavi ortası ışınlı MN	Tedavi sonu ışsız MN	Tedavi sonu ışınlı MN
RT1	17,2	31,2	11,7	20,7	3,9	17,2
RT2	12,06	23,9	5,2	22,7	3,8	15,4
RT3	7,15	17,8	6,7	19,00	4,7	10,6
RT4	8,1	17,3	7,01	10	9,8	29,8
RT5	10,38	15,07	8,54	11,6	12,7	21,2
RT6	4,32	12,23	4,4	19,7	11,3	15,14

RT7	6,97	16,8	4,51	15,27	1,79	24,9
RT8	9,2	16,17	10,66	32,3	17,45	30,1
RT9	5,36	12,8	8,19	15,1	9,4	23,38
RT10	6,32	21,9	4,64	20,9		
RT11	8,4	13,7	12,37	23,5	24,6	38,5
RT12	3,13	17,29	24,4	42,1		
KRT1	12,4	23,2	6,06	27,2	13,3	31,2
KRT2	7,8	34,2	5,08	24,8	19,50	25,6
KRT3	9,6	22,4	3,8	19,4		
KRT4	12,8	18,75	5,88	11,6	18,02	30,13
KRT5	6,24	8,88	12,8	23,8	10,3	31,5
KRT6	11,3	19,8	3,64	17,28	18,9	32,4
KRT7	8,67	11,78	5,15	16,4	19,4	31,6
KRT8	4,22	10,72	11,12	18,75	16,9	25,82
KRT9	6,22	8,84	12,9	20,51	21,4	33,4
KRT10	4,5	11	3,93	19,21		

NDi Eastmond ve Tucker'in yöntemine göre hesaplanmıştır. Her örnekten, 500 hücre sayılmış, bu sayıma bir, iki, üç ve dört çekirdekli hücreler dâhil edilmiş ve $NDi = (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4)/N$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. RT ve KRT hastalarının tedavi öncesi, ortası ve sonunda ve kontrol grubunun örneklerinde ışıklı ve ışısız olarak saptanan ND indeksleri Tablo 3.5 ve 3.6'da gösterilmektedir.

Tablo 3.5: RT ve KRT hastalarının Division indeksleri

Olgu	Tedavi öncesi ışınısız NDi	Tedavi öncesi ışınılı NDi	Tedavi ortası ışınısız Ndi	Tedavi ortası ışınılı NDi	Tedavi sonu ışınısız NDi	Tedavi sonu ışınılı NDi
RT1	1,78	1,534	1,55	1,74	1,9	1,74
RT2	1,39	1,32	1,43	1,4	1,49	1,38
RT3	1,44	1,43	1,61	1,32	1,8	1,6
RT4	1,28	1,26	1,4	1,2	1,37	1,37
RT5	1,55	1,55	1,74	1,51	1,55	1,5
RT6	1,42	1,45	1,02	1,29	1,38	1,2
RT7	1,8	1,65	1,54	1,49	1,74	1,57
RT8	1,51	1,53	1,26	1,14	1,28	1,15
RT9	1,56	1,3	1,49	1,51	1,7	1,57
RT10	1,45	1,27	1,65	1,16		
RT11	1,53	1,39	1,35	1,31	1,42	1,37
RT12	1,33	1,23	1,27	1,24		
KRT1	1,07	1,18	1,44	1,28	1,6	1,52
KRT2	1,18	1,23	1,49	1,49	1,3	1,26
KRT3	1,51	1,27	1,49	1,4		

KRT4	1,55	1,45	1,46	1,27	1,43	1,54
KRT5	1,44	1,24	1,39	1,3	1,37	1,18
KRT6	1,62	1,6	1,27	1,25	1,57	1,52
KRT7	1,67	1,62	1,17	1,35	1,39	1,32
KRT8	1,43	1,31	1,31	1,3	1,42	1,36
KRT9	1,35	1,36	1,43	1,42	1,04	1,06
KRT10	1,42	1,39	1,3	1,35		

Tablo 3.6: Kontrol grubunun MN ve ND indeksi

Olgu	İşinsiz MN (%)	İşinli MN (%)	İşinsiz NDi	İşinli NDi
1	2,35	12,27	1,7	1,34
2	2,06	15,06	1,73	1,24
3	1,77	17,4	1,44	1,68
4	3,1	17,5	1,59	1,41
5	3,14	12,4	1,53	1,25
6	1,4	17,1	1,47	1,27
7	2,1	13,12	1,59	1,49
8	1,1	15,8	1,7	1,48
9	2,23	14,2	1,74	1,29
10	2,3	19,8	1,74	1,53

RT, KRT ve Kontrol grubuna ait tedavi öncesi, ortası ve sonrasında ışınli ve ışinsiz örneklerindeki MN sıklıkları (Tablo 3.7) ve NDi için (Tablo 3.8) ortalama ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

Tablo 3.7: RT, KRT ve Kontrol grubuna ait tedavi öncesi, ortası ve sonrasında ışınli ve ışinsiz örneklerindeki MN sıklıkları

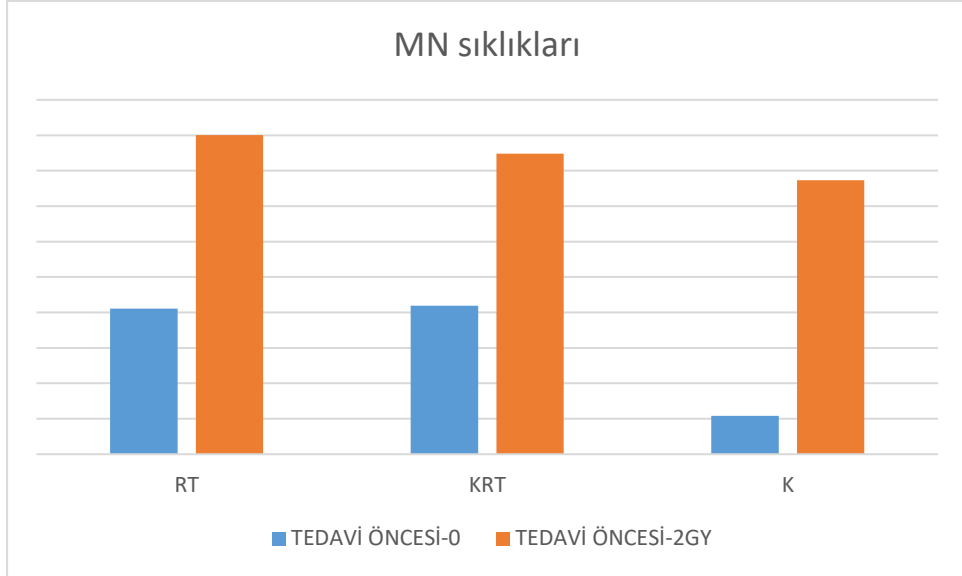
Olgu	RT (MN ortalama, standart sapma)	KRT (MN ortalama, standart sapma)	Kontrol (MN ortalama, standart sapma)
Tedavi öncesi ışinsiz	8,22 (3,13-17,20) \pm 3,77	8,38 (4,22-12,80) \pm 3,12	2,16 (1,10-3,14) \pm 0,65
Tedavi öncesi ışınli	18,01 (12,23-31,20) \pm 5,37	16,96 (8,84-34,20) \pm 8,23	15,47 (12,27-19,80) \pm 2,50
Tedavi ortası ışinsiz	9,03 (4,40-24,40) \pm 5,59	7,04 (3,64-12,90) \pm 3,74	
Tedavi ortası ışınli	21,07 (10,00-42,10) \pm 8,87	19,90 (11,60-27,20) \pm 4,51	
Tedavi sonu ışinsiz	9,94 (1,79-24,60) \pm 7,06	17,22 (10,30-21,40) \pm 3,67	
Tedavi sonu ışınli	22,62(10,60-38,50) \pm 8,49	30,21 (25,60-33,40) \pm 2,93	

Tablo 3.8: RT, KRT ve Kontrol grubuna ait tedavi öncesi, ortası ve sonrasında ışınli ve ışinsiz örneklerdeki ND indeksleri

Olgu	RT (NDi ortalama, standart sapma)	KRT (NDi ortalama, standart sapma)	Kontrol (NDi ortalama, standart sapma)
Tedavi öncesi ışinsiz	1,50 (1,28-1,80) \pm 0,16	1,42 (1,07-1,67) \pm 0,19	1,62 (1,44-1,74) \pm 0,11
Tedavi öncesi ışınli	1,41 (1,23-1,65) \pm 0,14	1,37 (1,18-1,62) \pm 0,15	1,40 (1,24-1,68) \pm 0,15
Tedavi ortası ışinsiz	1,44 (1,02-1,74) \pm 0,20	1,38 (1,17-1,49) \pm 0,11	
Tedavi ortası ışınli	1,36 (1,14-1,74) \pm 0,18	1,34 (1,25-1,49) \pm 0,08	
Tedavi sonu ışinsiz	1,56 (1,28-1,90) \pm 0,21	1,39 (1,04-1,60) \pm 0,17	
Tedavi sonu ışınli	1,45 (1,15-1,74) \pm 0,18	1,35 (1,06-1,54) \pm 0,18	

Tedavi öncesi ışınli ve ışinsiz MN sıklıkları

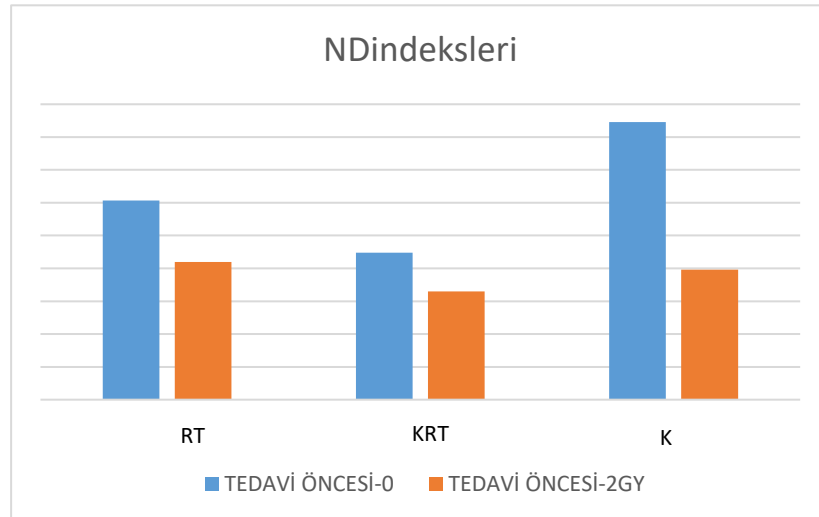
RT ve KRT olgu gruplarının tedavi öncesi ışınlanmadan saptanan MN sıklıkları ile kontrol grubu MN sıklığı tek yönlü varyans analizi ANOVA yöntemi ile değerlendirildi. RT ve KRT grupları arasında anlamlı fark bulunamazken ($p=1,000$), RT ile kontrol grubu arasında ($p=0,000$) ve KRT ile kontrol grubu ($p=0,000$) arasında anlamlı fark gözlemlendi. Aynı testler, 2 Gy ile ışınlanan örneklerdeki MN sıklıkları için de gerçekleştirildi ve RT, KRT ve kontrol grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,598$). (Şekil 3.1)



Şekil 3.1: RT, KRT tedavi öncesi ve kontrol grubunun ışıklı ve ışısız MN sıklıkları

Tedavi öncesi ışıklı ve ışısız ND indeksleri

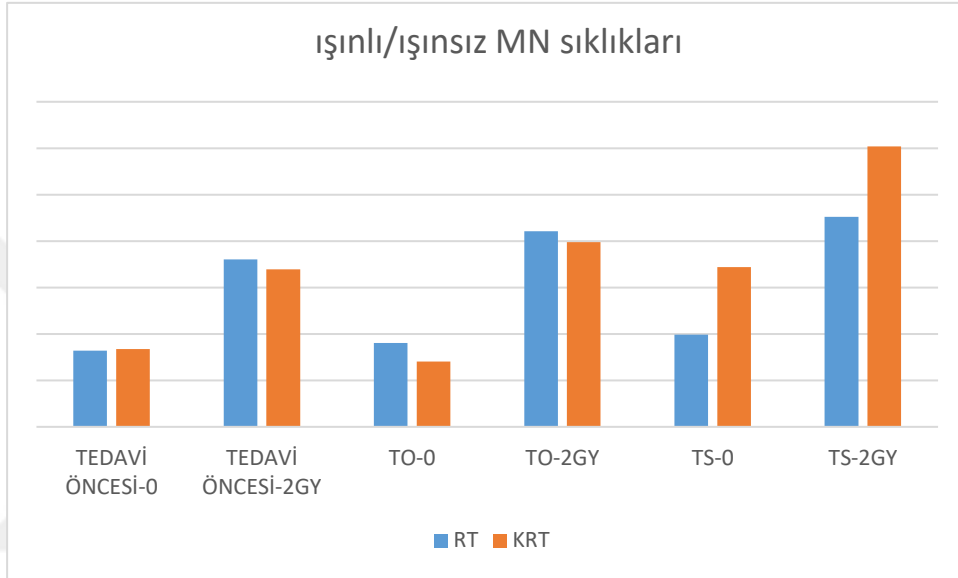
RT ve KRT olgu gruplarının tedavi öncesi, ışılanmadan elde edilen ND indeksleri ile kontrol grubu ND indeksi tek yönlü varyans analizi ANOVA yöntemi ile değerlendirildi. RT ve KRT grupları arasında ($p=0,736$); RT ve kontrol grubu arasında ($p=0,253$) herhangi bir fark bulunmadı. KRT ve kontrol grubu arasında ($p=0,024$) anlamlı fark gözlemlendi. Aynı testler, 2 Gy ışılanan kan örneklerinde bulunan ND indeksleri için de gerçekleştirildi ve RT, KRT ve kontrol grupları arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p=0,763$). (Şekil 3.2)



Şekil 3.2: RT, KRT tedavi öncesi ve kontrol grubunun ışıklı ve ışısız ND indeksleri

Tedavi gruplarına göre MN sıklıkları

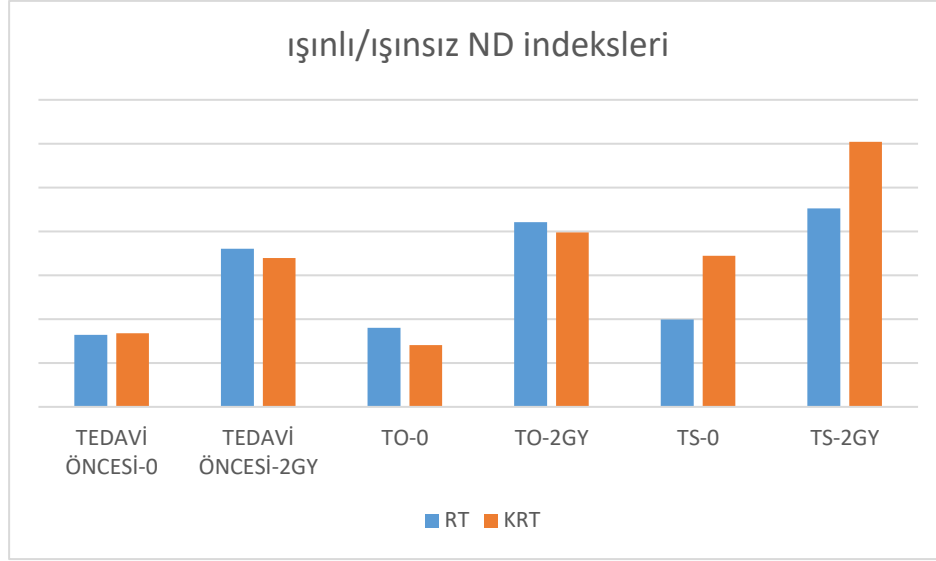
RT ve KRT olgu gruplarının ışınli ve ışınısız çalışılmasına göre MN sıklıkları Paired Samples T-testi ile değerlendirildi. RT grubunda ışınli/ışınısız MN sıklıkları tedavi öncesi ($p=0,000$), tedavi ortası ($p=0,000$), tedavi sonu ($p=0,000$) arasında anlamlı fark gözlemlenmiştir. KRT grubunda ışınli/ışınısız MN sıklıkları, tedavi öncesi ($p=0,004$), tedavi ortası ($p=0,000$), tedavi sonu ($p=0,000$) arasında anlamlı fark grlmştir. (şekil 3.3)



şekil 3.3: Işınli ve ışınısız çalışılmasına göre RT, KRT olgu gruplarındaki MN sıklıkları

Tedavi gruplarına göre ND indeksleri

Aynı testler, her iki grupta NDindeksleri için de gerçekleştirildi. RT grubunda tedavi öncesi ışınli/ışınısız NDindeksleri arasında ($p=0,008$) anlamlı fark bulunmuştur. Tedavi ortası ışınli/ışınısız NDindeksleri arasında fark bulunmazken ($p=0,187$), tedavi sonu ışınli/ışınısız NDindeksleri arasında ($p=0,000$) anlamlı fark gözlenmiştir. KRT grubunda ışınli/ışınısız NDindeksleri, tedavi öncesi ($p=0,019$), tedavi ortası ($p=0,339$) ve tedavi sonu ($p=0,181$) arasında anlamlı fark saptanmamıştır. (şekil 3.4)



Şekil 3.4: Işınılı ve ışınısız çalışılmasına göre RT, KRT olgu gruplarındaki ND indeksleri

Tedavi zamanlamasına göre MN sıklıkları

RT ve KRT olgu gruplarında ışınlanmadan ve ışınlanarak çalışılan kan örneklerindeki MN sıklıkları tedavi öncesi, ortası ve sonuna göre Repeated Measures ANOVA testi ile değerlendirildi. Değerlendirilme sonucunda, RT olgu grubunda, ışınılı ve ışınlanmadan çalışılan kan örnekleri için, tedavi öncesi ve tedavi ortası arasında, tedavi öncesi ve tedavi sonu arasında, tedavi ortası ve tedavi sonu MN sıklıkları arasında herhangi bir anlamlı fark bulunmamıştır. ($p>0,05$)

KRT olgu grubundaki ışınısız çalışılan örnekler için tedavi öncesi ve tedavi ortası arasında herhangi bir fark bulunmazken ($p=0,977$), tedavi öncesi ve tedavi sonu arasında ($p=0,005$) ve tedavi ortası ile tedavi sonu arasında ($p=0,009$) anlamlı fark bulunmuştur. Işınılı kan örneklerinde, tedavi öncesi ve tedavi ortası arasında anlamlı ilişki bulunamazken ($p=0,738$), tedavi öncesi ve tedavi sonu arasında ($p=0,028$), tedavi ortası ve tedavi sonu arasında anlamlı fark bulunmuştur. ($p=0,007$)

Tedavi zamanlamasına göre ND indeksleri

Aynı test kullanılarak ışınısız ve ışınılı NDI'leri tedavi zamanlamasına göre değerlendirilmiştir. RT olgu grubunda, ışınılı ve ışınlanmadan çalışılan kan örnekleri için, tedavi öncesi ve tedavi ortası arasında, tedavi öncesi ve tedavi sonu arasında, tedavi ortası ve tedavi sonu arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunmamıştır. ($p>0,05$)

KRT olgu grubunda, ışıklı ve ışıklanmadan çalışılan kan örnekleri için, tedavi öncesi ve tedavi ortası arasında, tedavi öncesi ve tedavi sonu arasında, tedavi ortası ve tedavi sonu NDi'leri arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunmamıştır. ($p>0,05$)

Yan etkiler ve tedavi aşamalarındaki MN sıklıkları

Tedavi zamanlamasına göre, ışıklı/ışıklısız MN sıklıkları ile hastalarda gözlenen toksisiteler arasındaki ilişki Pearson ve Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. İstatistik hesaplamalarda yan etkilerdeki olgu sayısı düşük olduğundan hasta grupları RT ve KRT birlikte değerlendirmeye alınmıştır. Tedavi öncesi ışıklısız MN sıklığı ile mukozit arasında ilişki bulunmuştur ($p=0,021$) ($r=0,49$). Tedavi öncesi ışıklı MN sıklığı ile kilo kaybı arasında ilişki bulunmuştur ($p=0,025$) ($r=0,48$). Tedavi sonu ışıklısız MN sıklıkları ile mukozit ($p=0,014$) ($r=0,57$), kserostomi ($p=0,007$) ($r=0,61$), disfaji ($p=0,000$) ($r=0,94$) ve kilo kaybı ($p=0,019$) ($r=0,55$) arasında ilişki bulunmuştur. Tedavi sonu ışıklı MN sıklıkları ile disfaji ($p=0,002$) ($r=0,67$) ve kilo kaybı ($p=0,005$) ($r=0,64$) arasında ilişki bulunmuştur.

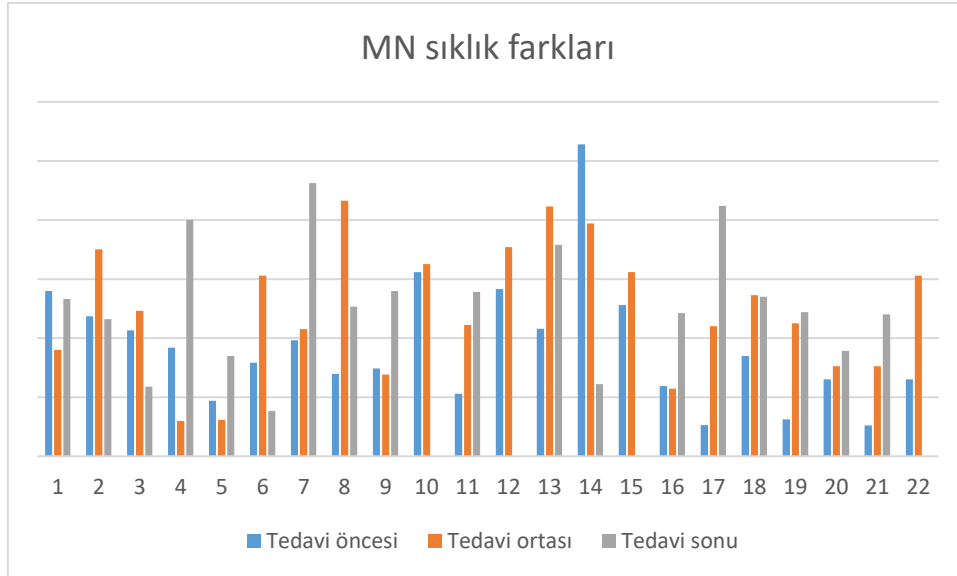
MN sıklık farklarına göre yan etkiler

RT ve KRT olgu grupları için her hastanın, tedavi öncesi, tedavi ortası ve tedavi sonu MN sıklıkları farkı hesaplanmıştır (Tablo 3.9, Şekil 3.5). RT ve KRT gruplarındaki MN sıklık farkları ile yan etkiler arasındaki ilişki araştırılmış, bunun için Spearman testi uygulanmıştır. RT olgu grubunda, tedavi öncesi MN sıklık farkı ile kserostomi ($p=0,011$) ($r=0,73$) arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. KRT olgu grubunda, tedavi sonu MN sıklık farkı ile disfaji ($p=0,030$) ($r=0,75$) arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Aynı test, RT ve KRT grubu birleştirilerek uygulanmış ve tedavi öncesi MN sıklık farkları ile kserostomi ($p=0,024$) ($r=0,48$) arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

Tablo 3.9: RT ve KRT olgu gruplarının MN sıklık farkları ve yan etkiler

Olgu grubu	Tedavi öncesi	Tedavi ortası	Tedavi sonu	Mukozit (derece)	Dermatit (derece)	Kserostomi (derece)	Disfaji (derece)	Ses kısıklığı (derece)	Kilo Kaybı (derece)
RT1	14	9	13,3	0	1	0	1	1	0
RT2	11,84	17,5	11,6	1	1	0	1	2	1
RT3	10,65	12,3	5,9	1	1	0	1	2	0
RT4	9,2	2,99	20	1	2	2	1	2	1

RT5	4,69	3,06	8,5	1	2	2	2	0	0
RT6	7,91	15,3	3,84	2	2	2	2	0	2
RT7	9,83	10,76	23,11	2	2	1	0	0	0
RT8	6,97	21,64	12,65	2	2	1	2	0	1
RT9	7,44	6,91	13,98	1	2	2	1	0	1
RT10	15,58	16,26		2	1	1	2	2	2
RT11	5,3	11,13	13,9	2	1	2	3	1	2
RT12	14,16	17,7		2	2	1	3	3	2
KRT1	10,8	21,14	17,9	1	2	1	2	2	1
KRT2	26,4	19,72	6,1	2	2	3	3	0	0
KRT3	12,8	15,6		1	1	1	3	0	2
KRT4	5,95	5,72	12,11	1	2	2	3	0	2
KRT5	2,64	11	21,2	1	2	2	2	1	2
KRT6	8,5	13,64	13,5	2	2	2	3	0	2
KRT7	3,11	11,25	12,2	2	1	2	3	0	2
KRT8	6,5	7,63	8,92	2	1	1	3	0	2
KRT9	2,62	7,61	12	2	2	2	3	3	2
KRT10	6,5	15,28		2	0	3	3	1	3



Şekil 3.5: Hastaların bireysel MN sıklık farkları

Klinik özellikler ve MN sıklıkları

RT ve KRT olgu gruplarındaki tedavi öncesi, tedavi ortası ve tedavi sonu ışınli ve ışinsız MN sıklıkları ile yaş, cinsiyet, sigara ve aktif sigara, RT fraksiyon sayısı, evre T, evre N arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. Klinik özelliklerdeki olgu sayısı düşük olduğundan hasta grupları RT ve KRT birlikte değerlendirmeye alınmıştır. Değerlendirme sonucunda, tedavi öncesi ışinsız MN sıklıkları ile sigara kullanımı arasında ($p=0,000$) ($r=0,70$) ilişki bulunmuştur. Tedavi sonu ışinsız MN sıklıkları ile evre N arasında ($p=0,000$) ($r=0,74$) ve RT fraksiyon sayısı arasında ($p=0,000$) ($r=0,76$) ilişki bulunmuştur. Tedavi sonu ışınli MN sıklıkları ile evre N ($p=0,031$) ($r=0,51$) ve RT fraksiyon sayısı arasında ($p=0,000$) ($r=0,81$) ilişki bulunmuştur.

4. TARTIŞMA

RT, radyasyonun sağlıklı hücreler üzerindeki etkisini azaltarak kanser hücrelerinin yok edilmesi için, hedeflenmiş X-ışınlarının kullanılmasıdır [209]. Tüm kanser hastalarının yaklaşık %70'ine RT uygulanmaktadır [210]. İyonlaştırıcı radyasyonun özelliklerinden biri, DNA'da onarılması zor ve/veya yanlış onarıma eğilimli lezyonlar, çift zincir kırıklarını indüklemeye yetkinliğidir [211]. Bu da mutasyonlara, disentrik ve asentrik fragmentler gibi kromozom anomalilerine neden olur. Radyasyon kaynaklı DNA hasar tamirinin, radyasyon tedavisine yanıtta ve radyoterapiye bağlı normal doku reaksiyonlarının gelişmesinde, hastaların yan etkilere karşı duyarlılığında ve genom bütünlüğünün korunmasında büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir. Birçok kanser hastasında radyasyon tedavisine bağlı, hastaların yaşam kalitesini etkileyen akut ve kronik yan etkiler görülmektedir. Bu etkiler, kanser hastalarına RT uygulandığı zaman doz sınırlayıcı faktörler arasında yer alabilmektedir [212]. Kanser hastalarının yaklaşık %5'i RT kaynaklı ciddi yan etkilerden zarar görmektedir [210]. Tedavi türünün farklılığı, klinik ve hastanın genetik yapısı gibi çeşitli faktörler normal doku toleransını etkileyebilmektedir. Ayrıca, normal doku yanıtlarının %80'indeki bireysel farklılıkların genetik varyasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. DNA ve kromozom hasarıyla ilişkili belirteçler biyolojik dozun tahmininde önem taşımaktadır [213].

RT'nin temel hedefi kanser hücre DNA'sı olmasına rağmen, normal hücrelerde de yapısal DNA değişikliklerine, özellikle kromozom kırıklarına ve anomalilerine sebep olmaktadır [214]. Yapılan birçok çalışma, kromozomal radyosensitivite ile kanser arasında ilişki varlığını göstermiştir. Radyosensitif bireylerde ikincil kanser riskinin arttığı gözlemlenmiştir. İyonlaştırıcı radyasyona duyarlı olan, özellikle ataksi-telenjiektazi gibi kromozom kararsızlık sendromlarına sahip hastalarda kansere yatkınlık gözlenmektedir. Ayrıca, Down sendromu, Li-Fraumeni, Wilms tümörü [215] ve Sistemik Lupus Eritematozus [216] gibi diğer birçok kansere eğilimli durumlarda da radyosensitivite saptanabilmektedir. Bununla birlikte, herhangi bir sendroma sahip olmayıp RT alan hastalarda da farklı seviyelerde radyosensitivite gelişmektedir. Radyosensitivitedeki farklılıkların tespit edilmesine yönelik farklı yöntemler kullanılmaktadır. Kromozomlarda anomali sıklığı, normal doku

radjosensitivitesinin belirleyicisi olarak değerlendirilmektedir. Radyasyona bağlı kromozom hasar sıklığının araştırıldığı yöntemler arasında G2 ve CBMN yöntemleri bulunmaktadır [217].

Biz de alışmamızda, RT ve KRT uygulanan BBK hastalarında radjosensitivitede bireysel farklılıklar ve tedavi sırasında lenfositlerde oluşan kromozomal hasarı incelemeyi amaçladık. Aynı zamanda çalışmamızda, bu hasarın RT ve KRT tedavi yöntemlerine göre farklılık gösterip göstermediği araştırılmıştır. CBMN yöntemi uygulanarak tedavinin farklı aşamalarında MN sıklıkları incelenmiş ve iki ayrı tedavi grubundaki hastaların klinik bulguları ve radjotoksisiteleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya, RT (n=12) ve KRT (n=10) uygulanan iki hasta grubu ve kontrol grubu olarak, hastaların yaş, cinsiyet dağılımıyla uyumlu seçilen 10 sağlıklı birey dahil edilmiş ve perifer kan lenfositleri hem ışınlı (2 Gy) hem de ışınlanmadan çalışılmıştır. Işınlayarak çalışmamızın amacı tedavi aşamalarındaki bireysel radjosensitiviteyi gözlemlemek olmuştur.

Tedavi öncesi RT ve KRT olgularındaki ışınsız MN sıklıkları ile kontrol grubunun sıklığı karşılaştırılmış, RT ve KRT olgularında MN sıklığının kontrol grubuna göre yüksek olduğu, kendi aralarında bir fark olmadığı gözlenmiştir. Bu durum, kansere bağlı MN sıklığının yüksek olmasına bağlanmıştır. Her üç olgu grubunda da ışınlı MN sıklıklarının ışınsıza göre yüksek olduğu, ancak gruplar arasında anlamlı fark bulunmadığı gözlenmiştir. Tedavi zamanlamasına göre RT ve KRT arasındaki MN sıklıkları incelenmiş, RT grubunda tedavi öncesi, tedavi ortası ve tedavi sonu arasında herhangi bir fark bulunmazken, KRT grubunda tedavi öncesi ve tedavi sonu arasında, tedavi ortası ve tedavi sonu arasında MN sıklık farkı gözlenmiştir. Bu farkın KRT hasta grubunda kemoterapötik ajanların etkisiyle olduğu düşünölmektedir. Ayrıca, RT ve KRT olgu gruplarında hücresel proliferasyonun belirlenmesi için amaçlanan ND indeksleri hesaplanmış, Kontrol grubundaki ND indeksi RT ve KRT grubuna göre yüksek bulunmuştur.

Guogyté ve ark (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, dört prostat kanseri ve bir rabdomyosarkomdan oluşan hasta grubunda, G2 (kromozomal radjosensitivite) yöntemi kullanılarak RT başında ve sonrasında alınan kanlar *in vitro* 1 Gy ışınlanarak (X-ışını ile) incelenmiştir. G2 yöntemi, hücre döngüsünün G2 fazında ışınlamayı takiben kromatid kırıklarının incelenmesine dayanan bir yöntem olup radjosensitivite tahmini için bir belirteç olarak önerilmektedir. Normal doku reaksiyonları şiddetli olan hastalarda lenfositlerde yüksek oranda kromatid kırığı gözlenmiş ve bu hastalar radjosensitif olarak kabul edilmiştir. Aynı

çalışmada, CBMN yöntemi de uygulanmıştır. Bu yöntem için ise aynı hastalardan yine radyoterapi öncesi ve sonrasında alınan kan örneklerinden biri 2 Gy *in vitro* ışınlanarak, diğeri ışınlanmadan çalışılmıştır. Sonuç olarak, ışınlanarak çalışılan kan örneklerinde gözlenen yüksek MN sıklığı normal doku reaksiyonları ile ilişkilendirilmiştir [218]. Biz de hastaların radyasyona duyarlılıklarını belirlemek için ışınlı ve ışınız MN sıklık farklarını hesapladık ve farkları yüksek olarak gözlenen hastalarda yan etkilerin (kserostomi, disfaji) daha şiddetli olduğunu gözledik.

Wegierek-Ciuk ve ark. tarafından (2021) yapılan araştırmada RT'nin tek başına veya kemoterapi ile birlikte (KRT) DNA hasarını nasıl indüklediği araştırılmıştır. KRT tedavisi alan 9 endometriyum kanseri hastası ve RT tedavisi alan 9 serviks kanseri hastasından RT öncesinde, başlamasından 3 hafta sonra ve sonunda kan örnekleri toplanmıştır. Alınan kan örneklerinin yarısı 2 Gy gama radyasyonu ile *ex-vivo* ışınlanarak, yarısı ise ışınlanmadan çalışılmıştır. Çalışmada, MN sıklıkları, apoptoz sıklıkları ve hücre proliferasyon indeksi değerlendirilmiştir. Grup ve tedavi türü (tek başına tedavi ve tedavi artı 2 Gy *ex vivo* maruziyet) arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. KRT hasta grubunun perifer kanı lenfositlerinde RT hasta grubu ile aynı düzeyde MN gözlenmiştir. KRT tedavi alan hasta grubunda yüksek düzeyde apoptoz ve güçlü hücre çoğalması gözlemlenmiştir. *Ex vivo* ışınlanarak çalışılan kan örneklerinde ise RT tedavisi alan hastalara oranla KRT tedavisi alan hastalarda daha az MN, daha çok apoptoz ve hücre proliferasyon indeksi görülmüştür bu da kemoterapinin radyasyon sitotoksitesisi üzerinde etkisi olduğuna kanıt olarak değerlendirilmiştir [207]. Biz de çalışmamızda, bu çalışmayla uyumlu olarak KRT olgu grubunda RT olgu grubuna göre yüksek ışınlı/ışınız MN sıklığı gözlemledik.

Batar ve ark. tarafından (2016) yapılan çalışmada meme kanserinde, RT'ye bağı akut yan etkilerle, DNA tamir genleri, XRCC1 (X-Ray Repair Cross Complementing 1) ve PARP1 (Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1) gen ekspresyon düzeyleri, protein ekspresyonundaki değişimler ve DNA hasar düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. DNA hasar seviyeleri için 2 Gy ile ışınlanmış lenfositlere MN yöntemi uygulanmıştır. Çalışmaya, akut yan etkileri olan 20 hastadan oluşan deney grubu ve yan etkileri olmayan 20 kontrol grubundan oluşan meme kanserli toplam 40 kadın hasta dahil edilmiştir. XRCC1 mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. Deney grubunda MN sıklığının arttığı gözlemlense de bu artış anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca, MN sıklığı ile XRCC1

protein seviyeleri arasında deney grubunda ve kontrol grubuna göre negatif korelasyon gözlenmiştir [219].

Francies ve ark. tarafından (2019) üçlü negatif meme kanserli hastalarda yapılan çalışmada MN testi kullanılarak lenfositlerde kromozom kararsızlığı ve radyosensitivite, luminal meme kanserli hastalar ve kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Kromozom radyosensitivitesi hücre siklusunun G0 (83 hasta, 90 kontrol) ve S/G2 (34 hasta, 17 kontrol) fazında değerlendirilmiştir. Alınan kan örnekleri 2 ve 4 Gy ışınlanarak çalışılmıştır. G0 MN testinde hem luminal meme kanserli hasta grubu, hem de üçlü negatif meme kanserli hasta grubunda, kontrol grubuna göre yüksek MN sıklığı gösterilmiştir. Tüm meme kanserli hasta grubunda kontrol grubuna göre radyosensitivitenin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak, üçlü negatif meme kanserli hasta grubunda ışınlama ile MN sıklığında artış gözlenmemiştir. Benzer şekilde, S/G2 evresinde ışınlama sonucu oluşan MN sıklığı, üçlü negatif meme kanserli hastaların %76'ında kontrol grubuna göre yüksek bulunmamıştır. Hem G0 hem de S/G2 fazında, luminal meme kanserli hastalarında, üçlü negatif meme kanserli hastalarına ve kontrol grubuna oranla kromozomal radyosensitiviteye yatkınlık gösterilmiştir [220].

Silva ve ark. Tarafından (2021) RT sonrası oluşabilecek yan etkilerin tahmini için CBMN yöntemi uygulanarak araştırma yapılmıştır. Araştırmaya 10 serviks kanserli hasta grubu dahil edilmiş ve tüm hastalar RT ile kemoterapi (KT) eşzamanlı olarak almıştır. Hastalardan radyoterapi öncesinde 2 tüp kan örnekleri alınmış, biri *in vitro* 2 Gy X-ışınına maruz bırakılarak, diğeri ise ışınlanmadan çalışılmıştır. Test sonuçlarına göre ışınlanmış kan örneklerindeki MN sıklığı ile yan etkilerin şiddeti arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Ayrıca, ışınlanmayan kan örnekleri ve MN sıklığı arasında da anlamlı fark görülmüştür. Sonuç olarak, CBMN yöntemiyle MN sıklığının incelenmesinin, serviks kanserinden etkilenen ve KT uygulanan hastalarda RT tedavisi sırasında oluşabilecek yan etkilerin öngörülmesine yardımcı olacağı ileri sürülmüştür [221].

Çalışmamızda bu çalışmalardan farklı olarak, sadece tedavi öncesi değil, tedavi ortası ve sonunda da gözlenen MN sıklıkları ve hastalardaki yan etkiler incelenmiştir. Tedavi öncesi ışınsız çalışılan kan örneklerindeki MN sıklığı ile mukozit arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Tedavi sonu ışınsız MN sıklıkları ile mukozit, disfaji ve kserostomi arasında, ışınlı MN sıklıkları ile disfaji arasında ilişki gözlenmiştir.

Dröge ve ark. tarafından (2021) rektum kanserli hastalarda yapılan çalışmada, CBMN yöntemi uygulanarak sitogenetik hasar incelenmiştir. *In-vivo* ve *in-vitro* ışınlamadan sonra bireyler arası farklılıklar ve radyosensitiviteyi göstermek için sitogenetik hasar oranı ile tümör tepkisi, sağkalım ve tedavi açısından hastaların sonuçları karşılaştırılmıştır. Sitogenetik hasarın, radyasyon dozu ile anlamlı artış gösterdiği ve bireyler arasında önemli ölçüde fark bulunduğu gösterilmiştir. Kadınların erkeklerden daha radyosensitif olduğu gözlenmiş, fakat yaşa bağlı önemli bir farklılık gözlenmemiştir. *In-vivo* KRT ve *in-vitro* ışınlamadan sonra lenfositlerde kalıcı sitogenetik hasar bulunmuş, ancak sitogenetik hasar üzerinde cinsiyet ve ışınlanan hedef bölgenin büyüklüğünün etkisi olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada, *in-vivo* ve *in-vitro* ışınlamadan sonra kalıcı sitogenetik hasar, bireysel radyosensitivite için genetik faktörlerin önemini gösterse de bu sitogenetik hasarın, rektal kanser hastalarında KRT yanıtı için yeterli bir biyobelirteç olmadığı sonucuna varılmıştır [222].

Çalışmamızda kadın olgu sayısı düşük olduğundan cinsiyete göre, hastaların yaş dağılımları farklı olmadığı için, yaşa göre değerlendirme anlamlı bir sonuç vermemiştir. Bireyler arasındaki tedavi öncesi MN sıklıkları ile sigara kullanımı arasında, tedavi sonu ışsız ve ışınlı MN sıklıkları ile evre N ve radyasyon fraksiyonu ile ilişkili bulunmuştur.

Yaptığımız literatür araştırmasında BBK'de RT'nin oluşturduğu kromozom hasar ve radyosensitivitenin araştırıldığı çalışmalara rastlanmıştır. Borgmann ve ark. tarafından (2002) BBK'de yapılan çalışmada, RT sonrası geç doku yanıtıyla dermal fibroblastlarda hücresel duyarlılık ve DNA tamir kapasitesi, lenfositlerde de kromozom anomalileri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmaya küratif RT'den 2-7 yıl sonra, geç doku reaksiyonlarını (mukozit, kserestomi, fibroz, telenjiektazi) hafif (evre 1) ve şiddetli (evre 3) olarak gösteren 16 hasta dahil edilmiştir. Evre 3 doku reaksiyonu gösteren hastalarda ataksi telenjiektazi (AT), Nijmegen Kırılma Sendromu (NBS), MRE11, RAD50 ve DNA ligaz IV genlerindeki mutasyonlar araştırılmış ve mutasyon saptanmamıştır. Biyopsiyle elde edilen fibroblastlarda, sabit alan jel elektroforezi kullanılarak koloni oluşumu ve DNA çift zincir kırılmalarının (DSB) uyarılması ve tamiri yoluyla hücresel duyarlılık incelenmiştir. Lenfositlerdeki kromozom hasarını incelemek için konvansiyonel kromozom analizi veya G0 fazında prematür kromozom kondansasyon (PCC) yöntemi uygulanmıştır. Çalışmada, fibroblastlarda hücresel radyosensitivite veya DSB tamir kapasitesiyle geç doku reaksiyonları arasında herhangi bir ilişki olmadığı sonucuna varılmış, fakat lenfositlerde ölçülen kromozom hasarında anlamlı fark bulunmuştur. Aşırı reaksiyon gösteren hastalardan alınan lenfositlerde, *in vitro* ışınlamadan

sonra, hafif reaksiyon gösteren hastalardan alınan lenfositlere oranla kromozom anomali ve PCC sıklığının yüksek olduğu gözlenmiştir [223].

Burgaz ve ark. tarafından (2011) yapılan çalışmada BBK'li hastalar ve birinci dereceli akrabalarında genetik hasar iki farklı dokuda araştırılmıştır. 59 BBK'li hasta ve 34 birinci dereceli akraba ve 31 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubundan alınan perifer kanı lenfositleri ve yanak mukoza hücrelerine MN yöntemi uygulanarak çalışılmıştır. BBK'li hasta lenfositlerinde genetik hasar, kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik göstermiştir. Benzer bulgular yanak mukoza hücreleri için de elde edilmiştir. Ayrıca, BBK'li hastaların birinci dereceli akrabalarının lenfositleri kontrol grubuna göre yüksek kromozom hasarını göstermiştir. Araştırmacılar bu durumu akrabaların BBK'ne karşı artmış duyarlılığa sahip oldukları anlamına geldiği şeklinde yorumlamışlardır [224].

Unal ve ark. tarafından (2016) yapılan çalışmada BBK'li hastalarda RT ve KRT'nin uzun dönemde oluşturduğu sitogenetik hasar değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, RT (10 hasta) ve KRT (10 hasta) ile tedavi edilen 20 hasta grubu ve 9 sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu değerlendirilmeye alınmış, CBMN yöntemi uygulanmıştır. Venöz kan örnekleri tedavi tamamlanmasından sonra 60-239 aylarda alınmıştır. Hastalardaki binükleer lenfositlerdeki nükleer divisyon indeksi (NDİ) ve MN sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı farklı gözlenmiştir. Mononükleer lenfositlerdeki NDİ ve MN sıklığı kontrol grubunda KRT ve RT alan hastalarla kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Fakat, KRT ve RT tedavisi alan hasta grupları arasında herhangi bir anlamlı değişiklik görülmemiştir. Çalışmada, RT sonrası baş boyun kanserli hastaların medikal takibinde mononükleer ve binükleer lenfositlerin MN sıklığı, RT'nin sitogenetik hasarını değerlendirmede önemli olabileceği sonucuna varılmıştır [225]. Bizim de daha sonraki hedeflerimizden biri, çalışmamıza dahil edilen hastalarda uzun dönemdeki sitogenetik hasarı ve kronik yan etkilerini araştırmaktır.

Hintzsche ve ark.'nın (2012) çalışmasında, BBK'li hastaların radyasyonla tedavisi sırasında 4 farklı zaman diliminde (RT başlamadan önce, başlangıcından 2,4 ve 6 hafta sonra) genomik hasar seviyesi normal yanak mukozası hücreleri kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak, RT başlangıcından iki hafta sonra genomik hasar gözlemlenebilmiş ve tedavi bitiminden sonra genomik hasar seviyesinin başlangıç düzeyine geri döndüğü görülmüştür. RT'ye eklenen kemoterapi ile yaş, cinsiyet ve tümör evresinin genomik hasar oluşumu üzerinde bir etkisi olmadığı bildirilmiştir [226]. Bizim çalışmamızda KRT uygulanan hasta grubunun

lenfositlerinde tedavi sonunda MN sıklığında anlamlı artış gözlenmiş, RT uygulanan hasta grubunda gözlenmemiştir.

Minaei ve ark. tarafından (2016) özofagus kanserinde yapılan araştırmaya 23 KRT, 15 RT tedavisi uygulanan hasta dahil edilmiş ve MN yöntemiyle RT ve KT'nin etkileri değerlendirilmiştir. Hastalardan kan örnekleri, tedavi öncesinde, sırasında ve sonrasında alınarak çalışılmıştır. Tedavi öncesi RT ve KRT grupları arasında MN sıklığında fark gözlenmemiş, tedavi ortasında her iki grupta da MN sıklığında tedavi öncesine göre 4 kat artış gösterilmiştir. Tedavi sonunda KRT grubundaki MN sıklığında RT grubuna göre anlamlı artış gözlemlenmiştir [227]. Bizim olgu grubumuza sadece bir özofagus kanseri hastası dahil edilebilmiş, KRT grubunda yer alan hastadan, sağlık sorunları nedeniyle tedavi sonunda kan alınmadığından tedavi sonu MN sıklığı saptanamıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tedavi öncesi ışınlanan lenfositlerdeki MN sıklığının yan etkilerle ilişkili olduğu gösterilmiş ve CBMN yönteminin RT tedavisi sırasında oluşabilecek yan etkilerin öngörülmesine yardımcı olacağı düşünülmüştür.

Tedavi zamanlamasına göre çalışılan KRT olgu grubunda RT'ye göre daha yüksek MN sıklığının görülmesi, KRT'nin radyotoksosite üzerinde etkisi olabileceğine işaret edebilir.

RT'ye eklenen kemoterapi ile evre dağılımı, sigara kullanımı, tümör evresinin genomik hasar oluşumu üzerinde bir etkisi olabileceği görülmüştür.

Hasta gruplarının tedavi sonrası klinik izlemi devam ettiğinden, çalışmanın bir sonraki hedefi, hastaların uzun süreli takiplerinde CBMN yöntemi tekrarlanarak gelişebilecek kronik etkilerin de değerlendirilmesi ve elde ettiğimiz bulgularla karşılaştırılmasıdır. Böylece, aynı hasta gruplarında RT ve KRT yanıtlarının uzun süreli izleminde MN sıklığının önemi ortaya konacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen bulgular radyosensitivite belirlenmesinde, MN sıklığının incelenmesinin önemli olduğunu göstermekte, ancak daha verimli sonuçların elde edilmesi için, olgu sayısının artırılarak çalışmanın devam ettirilmesi ve başka çalışmalarla desteklenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Vigneswaran N, Williams MD.. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2014; 26: 123–141.
- [2]. Chi AC, Day TA, Neville BW.. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 401–421
- [3]. Mehanna H, Paleri V, West CM, Nutting C Head and neck cancer—part 1: epidemiology, presentation, and prevention. *BMJ*. 2010; 341c4684
- [4]. Afnan F. Alfouzan Radiation therapy in head and neck cancer - Saudi Medical Journal March 2021, 42 (3) 247-254; DOI:<https://doi.org/10.15537/smj.2021.42.3.20210660>
- [5]. Saloura V, Langerman A, Rudra S, Chin R, Cohen EE.. Multidisciplinary care of the patient with head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2013; 22: 179–215.
- [6]. Marur S, Forastiere AA.. Head and neck squamous cell carcinoma: Update on epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2016; 91: 386–396
- [7]. Michael Fenech - Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes* 2020, 11(10), 1203; DOI:<https://doi.org/10.3390/genes11101203>
- [8]. Q M Chow.L. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 2020 Jan 2;382(1):60-72 doi: 10.1056/NEJMra1715715.
- [9]. Döbrössy, L. (2005).Epidemiology of head and neck cancer. Magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Reviews*, 24:9-17
- [10]. Chong VF, Ong CK. Nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Radiol*. 2008 Jun;66(3):437-47.

- [11]. Mukherji SK, Castillo M. Normal cross-sectional anatomy of the nasopharynx, oropharynx, and oral cavity. *Neuroimaging Clin N Am*. 1998 Feb;8(1):211-8
- [12]. Pohunek P. Development, structure and function of the upper airways. *Paediatr Respir Rev*. 2004 Mar;5(1):2-8.
- [13]. McLaughlin KE, Jacobs IN, Todd NW, Gussack GS, Carlson G. Management of nasopharyngeal and oropharyngeal stenosis in children. *Laryngoscope*. 1997 Oct;107(10):1322-31
- [14]. Shaw SM, Martino R. The normal swallow: muscular and neurophysiological control. *Otolaryngol Clin North Am*. 2013 Dec;46(6):937-56.
- [15]. Juan Suárez-Quintanilla; Alejandro Fernández Cabrera; Sandeep Sharma. *Anatomy, Head and Neck, Larynx*. 2022 Sep 5.
- [16]. R. Sigal- Oral cavity, oropharynx, and salivary glands *Neuroimaging Clin N Am*, 6 (1996), pp. 379-400
- [17]. M. Becker Oral cavity, oropharynx, and hypopharynx *Semin Roentgenol*, 35 (2000), pp. 21-30
- [18]. Chong VF, Ong CK. Nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Radiol*. 2008 Jun;66(3):437-47.
- [19]. Sung H, Ferlay J, Siegel R L et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209–249.
- [20]. Johnson D E, Burtneß B, Leemans C R, Lui V W Y, Bauman J E, Grandis J R. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020; 6: 92.

- [21]. Bravi F, Lee Y-C A, Hashibe M et al. Lessons learned from the INHANCE consortium: An overview of recent results on head and neck cancer. *Oral Dis* 2021; 27: 73–93.
- [22]. Shield K D, Ferlay J, Jemal A et al. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. *CA Cancer J Clin* 2017; 67: 51–64.
- [23]. Miranda-Filho A, Bray F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncol* 2020; 102: 104551
- [24]. Bosetti C, Carioli G, Santucci C et al. Global trends in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 2020; 147: 1040–1049
- [25]. de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: A worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2), e180–e190. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7)
- [26]. Li, Y., & Xu, C. (2017). Human papillomavirus-related cancers. *Infectious Agents Associated Cancers: Epidemiology and Molecular Biology*, 23–34. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5765-6_3
- [27]. Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.115> [S1-0]
- [28]. Muñoz, N., Bosch, F. X., De Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., & Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518–527. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>
- [29]. Scheurer, M. E., Tortolero-Luna, G., & Adler-Storthz, K. (2005). Human papillomavirus infection: Biology, epidemiology, and prevention. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 15(5). <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2005.00246.x>

- [30]. Herrero, R., Castellsagué, X., Pawlita, M., Lissowska, J., Kee, F., Balaram, P., ... Franceschi, S. (2003). Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study, *Journal of the National Cancer Institute*, 95(23), 1772-1783.
- [31]. Gillison, M.L. (2004). Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity, In *Seminars in oncology*, 31(6), 744-754.
- [32]. Pinatti, L. M., Walline, H. M., & Carey, T. E. (2018). Human papillomavirus genome integration and head and neck cancer. *Journal of Dental Research*, 97(6), 691–700. <https://doi.org/10.1177/0022034517744213>
- [33]. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002; 21: 1510–17.
- [34]. Akagi, K., Li, J., Broutian, T. R., Padilla-Nash, H., Xiao, W., Jiang, B., & Gillison, M. L. (2014). Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Research*, 24(2), 185–199. <https://doi.org/10.1101/gr.164806.113>
- [35]. Bakkalci, D., Jia, Y., Winter, J. R., Lewis, J. E., Taylor, G. S., & Stagg, H. R. (2020). Risk factors for Epstein Barr virus-associated cancers: A systematic review, critical appraisal, and mapping of the epidemiological evidence. *Journal of Global Health*, 10(1). <https://doi.org/10.7189/jogh.10.010405>
- [36]. Chang, J.S., Lo, H.I., Wong, T.Y., Huang, C.C., Lee, W.T., Tsai, S.T., ... Yang, M.W. (2013). Investigating the association between oral hygiene and head and neck cancer, *Oral oncology*, 49(10), 1010-1017
- [37]. Javed, F., & Warnakulasuriya, S. (2016). Is there a relationship between periodontal disease and oral cancer? A systematic review of currently available evidence, *Critical reviews in oncology/hematology*, 97, 197-205

- [38]. Rosenquist, K., Wennerberg, J., Schildt, E.B., Bladström, A., Göran Hansson, B., & Andersson, G. (2005). Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden, *Acta oto-laryngologica*, 125(12), 1327- 1336
- [39]. Winn DM, Ziegler RG, Pickle LW, et al. Diet in the etiology of oral and pharyngeal cancer among women from the southern United States. *Cancer Res* 1984;44:1216
- [40]. Bosetti C, La Vecchia C, Talamini R, et al. Food groups and laryngeal cancer risk: a case-control study in Italy and Switzerland. *Int J Cancer* 2002;20:355-60
- [41]. Yu MC. Diet and nasopharyngeal carcinoma. *FEMS Microbiol Immunol* 1990;2(4):235-42
- [42]. Tonini, G., et al., New molecular insights in tobacco-induced lung cancer. *Future Oncology*, 2013. 9(5): p. 649-655.
- [43]. Spira, A., et al., Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. 101(27): p. 10143-10148
- [44]. Vassallo, R., et al., Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses. *Molecular immunology*, 2008. 45(12): p.3321-3329
- [45]. Jethwa AR, Khariwala SS. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36:411–23. doi: 10.1007/s10555-017-9689-6
- [46]. Karam-Hage M, Oughli HA, Rabius V, et al. Tobacco cessation treatment pathways for patients with cancer: 10 years in the making. *J Natl Compr Canc Netw.* 2016;14:1469–77. doi: 10.6004/jnccn.2016.0153.

- [47]. Chang EHE, Braith A, Hitsman B, Schnoll RA. Treating nicotine dependence and preventing smoking relapse in cancer patients. *Expert Rev Qual Life Cancer Care*. 2017;2:23–39. doi: 10.1080/23809000.2017.1271981
- [48]. Moubayed SP, Sampalis JS, Ayad T, et al. Predicting depression and quality of life among long-term head and neck cancer survivors. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;152:91–7. doi: 10.1177/0194599814557772
- [49]. Bloom EL, Oliver JA, Sutton SK, Brandon TH, Jacobsen PB, Simmons VN. Post-operative smoking status in lung and head and neck cancer patients: association with depressive symptomatology, pain, and fatigue. *Psychooncology*. 2015;24:1012–19. doi: 10.1002/pon.3682
- [50]. Marziliano A, Teckie S, A. Diefenbach M. Alcohol-related head and neck cancer: Summary of the literature. *Head & Neck*. 2020;42:732–738. doi: 10.1002/hed.26023
- [51]. Cadoni G, Giraldi L, Petrelli L, et al. Prognostic factors in head and neck cancer: a 10-year retrospective analysis in a single-institution in Italy. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2017;37(6): 458-466
- [52]. Raguse JD, Hossamo J, Tinhofer I, et al. Patient and treatment-related risk factors for osteoradionecrosis of the jaw in patients with head and neck cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;121(3):215-221.e211
- [53]. Sawabe M, Ito H, Oze A, et al. Heterogenous impact of alcohol consumption according to treatment method on survival in head and neck cancer: a prospective study. *Cancer Sci*. 2017; 108:91-100.
- [54]. Koch R, Wittekindt C, Altendorf-Hofmann A, Singer S, Guntinas-Lichius O. Employment pathways and work-related issues in head and neck cancer survivors. *Head Neck*. 2015;37(4):585-593.
- [55]. Vartanian JG, Carvalho AL, Toyota J, Kowalski IS, Kowalski LP. Socioeconomic effects of and risk factors for disability in long-term survivors

of head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132(1):32-35

- [56]. Paweł R, Łukasz M, Ireneusz M. Genetic predeterminations of head and neck cancer. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 2008; tom 62: 490-501
- [57]. Shin D.M., Charuruks N., Lippman S.M., Lee J.J., Ro J.Y., Hong W.K., Hittelman W.N.: p53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2001; 10: 603–609
- [58]. Homann N., Nees M., Conradt C., Dietz A., Weidauer H., Maier H., Bosch F.X.: Overexpression of p53 in tumor-distant epithelia of head and neck cancer patients is associated with an increased incidence of second primary carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 290–296
- [59]. Nanda R., Huo D., Cook M., Chen L., Hope K., Cummings S., Olopade O.I.: Outcomes after breast cancer in an ethnically diverse cohort of high-risk patients: Differences in survival based on BRCA1/BRCA2 mutation status. *J. Clin. Oncol.*, 2007; 25, 18S
- [60]. Lynch H.T., de la Chapelle A.: Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2003; 348: 919–932
- [61]. Cavaciuti E., Laugé A., Janin N., Ossian K., Hall J., Stoppa-Lyonnet D., Andrieu N.: Cancer risk according to type and location of ATM mutation in ataxia-telangiectasia families. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005; 42: 1–9
- [62]. Zheng Z., Park J.Y., Guillemette C., Schantz S.P., Lazarus P.: Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 19: 1411–1418
- [63]. Hayes J.D., Strange R.C.: Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 2000; 61: 154–166
- [64]. Benhamou S., Lee W.J., Alexandrie A.K., Boffetta P., Bouchardy C., Butkiewicz D., Brockmüller J., Clapper M.L., Daly A., Dolzan V., Ford J., Gaspari L., Haugen A., Hirvonen A., Husgafvel-Pursiainen K., Ingelman-Sundberg M., Kalina I., Kihara M., Kremers P., Le Marchand L., London S.J., Nazar-Stewart V., Onon-Kihara M., Rannug A., Romkes M., Ryberg D., Seidegard J., Shields P., Strange R.C., Stücker I., To Figueras J., Brennan P.,

- Taioli E.: Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 1343–1350
- [65]. Hashibe M., Brennan P., Strange R.C., Bhisey R., Cascorbi I., Lazarus P., Oude Ophuis M.B., Benhamou S., Foulkes W.D., Katoh T., Coutelle C., Romkes M., Gaspari L., Taioli E., Boffetta P.: Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2003; 12: 1509–1517
- [66]. To-Figueras J., Gene M., Gómez-Catalán J., Piqué E., Borrego N., Caballero M., Cruellas F., Raya A., Dicenta M., Corbella J.: Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Lett.*, 2002; 187: 95–101
- [67]. Wenghoefer M., Pesch B., Harth V., Broede P., Fronhoffs S., Landt O., Brüning T., Abel J., Bolt H.M., Herberhold C., Vetter H., Ko Y.D.: Association between head and neck cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Arch. Toxicol.*, 2003; 77: 37–41
- [68]. Cascorbi I., Henning S., Brockmüller J., Gephart J., Meisel C., Müller J.M., Loddenkemper R., Roots I.: Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant – 463A of myeloperoxidase gene. *Cancer Res.*, 2000; 60: 644–649
- [69]. Elahi A., Bendaly J., Zheng Z., Muscat J.E., Richie J.P. Jr., Schantz S.P., Lazarus P.: Detection of UGT1A10 polymorphisms and their association with orolaryngeal carcinoma risk. *Cancer*, 2003; 98: 872–880
- [70]. Nowacka-Zawisza M., Bryś M., Romanowicz-Makowska H., Kulig A., Krajewska W.M.: Genetic instability in the RAD51 and BRCA1 regions in breast cancer. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2007; 12: 192–205
- [71]. Peltomäki P.: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2003; 21: 1174–1179
- [72]. Wei Q., Eicher S.A., Guan Y., Cheng L., Xu J., Young L.N., Saunders K.C., Jiang H., Hong W.K., Spitz M.R., Strom S.S.: Reduced expression of hMLH1 and hGTBP/hMSH6: a risk factor for head and neck cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998; 7: 309–314

- [73]. Hsieh L.L., Chien H.T., Chen I.H., Liao C.T., Wang H.M., Jung S.M., Wang P.F., Chang J.T., Chen M.C., Cheng A.J.: The XRCC1 399Gln polymorphism and the frequency of p53 mutations in Taiwanese oral squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2003; 12: 439–443
- [74]. Sturgis E.M., Zheng R., Li L., Castillo E.J., Eicher S.A., Chen M., Strom S.S., Spitz M.R., Wei Q.: XPD/ERCC2 polymorphisms and risk of head and neck cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 2219–2223
- [75]. Turchi J.J., Henkels K.M., Zhou Y.: Cisplatin-DNA adducts inhibit translocation of the Ku subunits of DNA-PK. *Nucleic Acids Res.*, 2000; 28: 4634–4641
- [76]. Corde S., Biston M.C., Elleaume H., Estève F., Charvet A.M., Joubert A., Ducros V., Bohic S., Simionovici A., Brochard T., Nemoz C., Renier M., Troprès I., Fiedler S., Bravin A., Thomlinson W., Le Bas J.F., Balosso J.: Lack of cell death enhancement after irradiation with monochromatic synchrotron X rays at the K-shell edge of platinum incorporated in living SQ20B human cells as cis-diamminedichloro platinum(II). *Radiat. Res.*, 2002; 158: 763–770
- [77]. Pomerantz G.R., Grandis J.R.: The role of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr. Oncol. Rep.*, 2003; 5: 140–146
- [78]. Xia W., Lau Y.K., Zhang H.Z., Liu A.R., Li L., Kiyokawa N., Clayman G.L., Katz R.L., Hung M.C.: Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 1997; 3: 3–9
- [79]. Bianchi N.O., Bianchi M.S., Richard S.M.: Mitochondrial genome instability in human cancers. *Mutat. Res.*, 2001; 488: 9–23
- [80]. Lewis P.D., Baxter P., Griffiths P.A., Parry J.M., Skibiński D.O.: Detection of damage to the mitochondrial genome in the oncocytic cells of Warthin's tumour. *J. Pathol.* 2000; 191: 274–281
- [81]. Allegra E., Garozzo A., Lombardo N., De Clemente M., Carey T.E.: Mutations and polymorphisms in mitochondrial DNA in head and neck cancer cell lines. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.*, 2006; 26: 185–190
- [82]. Szyfter K.: Rola czynnika genetycznego w powstawaniu i przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani. *Postępy chirurgii głowy szyi*, 2002;1: 5–19

- [83]. Kujawski M., Jarmuż M., Rydzanicz M., Szukała K., Wierzbicka M., Grenman R., Golusiński W., Szyfter K.: Frequent chromosome Y loss in primary, second primary and metastatic squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Lett.*, 2004; 208: 95–101
- [84]. Bockmühl U., Schwendel A., Dietel M., Petersen I.: Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.*, 1996; 56: 5325–5329
- [85]. Akervall J.A., Jin Y., Wennerberg J.P., Zätterström U.K., Kjellén E., Mertens F., Willén R., Mandahl N., Heim S., Mitelman F.: Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 1995; 76: 853–859
- [86]. Meredith S.D., Levine P.A., Burns J.A., Gaffey M.J., Boyd J.C., Weiss L.M., Erickson N.L., Williams M.E.: Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1995; 121: 790–794
- [87]. Rubin J.S., Qiu L., Etkind P.: Amplification of the Int-2 gene in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Laryngol. Otol.*, 1995; 109:72–76
- [88]. Namazie A., Alavi S., Olopade O.I., Pauletti G., Aghamohammadi N., Aghamohammadi M., Gornbein J.A., Calcaterra TC., Slamon D.J., Wang M.B., Srivatsan E.S.: Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope*, 2002; 112: 472–481
- [89]. Yu Z., Weinberger P.M., Haffty B.G., Sasaki C., Zerillo C., Joe J., Kowalski D., Dziura J., Camp R.L., Rimm D.L., Psyrris A.: Cyclin D1 is a valuable prognostic marker in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 1160–1166
- [90]. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershengwald JE, Compton CC, Hess KR, et al. (Eds.). *AJCC Cancer Staging Manual (8th edition)*. Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017
- [91]. O'Sullivan B, Huang SH, Su J, et al. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International

Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol.* 2016;17:440–51. A large multicenter study proposed clinical TNM classification for HPV-related oropharyngeal cancer which was adopted by the 8th edition TNM

- [92]. Aliperti LA, Predina JD, Vachani A, Singhal S. Local and systemic recurrence is the Achilles heel of cancer surgery. *Ann Surg Oncol.* 2011;18:603–607
- [93]. Eldeeb H, Macmillan C, Elwell C, Hammod A. The effect of the surgical margins on the outcome of patients with head and neck squamous cell carcinoma: single institution experience. *Cancer Biol Med.* 2012;9:29–33
- [94]. Hinni ML, Ferlito A, Brandwein-Gensler MS, et al. Surgical margins in head and neck cancer: a contemporary review. *Head Neck.* 2013;35:1362–1370
- [95]. Woolgar JA, Triantafyllou A. A histopathological appraisal of surgical margins in oral and oropharyngeal cancer resection specimens. *Oral Oncol.* 2005;41:1034–1043
- [96]. McMahon J, O'Brien CJ, Pathak I, et al. Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003;41:224–231.
- [97]. Baxi SS, Pinheiro LC, Patil SM, Pfister DG, Oeffinger KC, Elkin EB. Causes of death in long-term survivors of head and neck cancer. *Cancer.* 2014;120:1507–1513.
- [98]. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012;31(15):1869-1883
- [99]. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules.* 2008;13(8):1551-1569
- [100]. Khan Faiz M (2003) *Physics of radiation therapy*, 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 3–4

- [101]. Case JT, Buschke F. 1958. History of radiation therapy . Progress in radiation therapy. Grune & Stratton;New York: p. 13–41.
- [102]. M. Beyzadeoglu et al., Basic Radiation Oncology, 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-030-87308-0_1
- [103]. Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol* 2003; 66: 253-262
- [104]. Rosenthal DI, Lewin JS, Eisbruch A. Prevention and treatment of dysphagia and aspiration after chemoradiation for head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2636-2643.
- [105]. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 199-212.
- [106]. Sciubba JJ, Goldenberg D. Oral complications of radiotherapy. *Lancet Oncol* 2006; 7: 175-183
- [107]. Beech N, Robinson S, Porceddu S, Batstone M. Dental management of patients irradiated for head and neck cancer. *Aust Dent J* 2014; 59: 20-28.
- [108]. Kojima Y, Yanamoto S, Umeda M, et al. Relationship between dental status and development of osteoradionecrosis of the jaw: a multicenter retrospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2017;124:139-45
- [109]. Stubblefield MD. Clinical evaluation and management of radiation fibrosis syndrome. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2017;28:89-100.
- [110]. Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Med* 2017;6:2918-31

- [111]. Ortigara GB, Schulz RE, Soldera EB, et al. Association between trismus and dysphagia-related quality of life in survivors of head and neck cancer in Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2019;128:235-42.
- [112]. Landier W. Ototoxicity and cancer therapy. *Cancer* 2016;122:1647-58
- [113]. Nader ME, Gidley PW. Challenges of hearing rehabilitation after radiation and chemotherapy. *J Neurol Surg B Skull Base* 2019;80:214-24.
- [114]. Munro TR. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res* 1970; 42: 451–70
- [115]. Cornforth MN, Bedford JS. A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat Res* 1987; 111: 385–405.
- [116]. Warters RL, Hofer KG. Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells. Elucidation of the primary site for radiation-induced division delay. *Radiat Res* 1977; 69: 348–58.
- [117]. Warters RL, Hofer KG, Harris CR, Smith JM. Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells: elucidation of the primary site of radiation damage. *Curr Top Radiat Res Q* 1978; 12: 389–407
- [118]. Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams and Wilkins 2006.
- [119]. Reith W (2016) Radiation biology and radiation protection. In: Vogl T, Reith W, Rummeny E (eds) *Diagnostic and interventional radiology*. Springer, Berlin, p 13
- [120]. Lewanski CR, Gullick WJ (2001) Radiotherapy and cellular signaling. *Lancet Oncol* 2:366
- [121]. Awwad HK (2005) Normal tissue radiosensitivity: prediction on deterministic or stochastic basis? *J Egypt Natl Canc Inst* 17(4):221–230. Review.
- [122]. E Hau, PH Graham. A brief review on the biological effects of radiation on cells. Volume 59 (3) 2012

- [123]. Halliwell B, Aruoma OI. (1991). DNA damage by oxygen-derived species; Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS letters* 281: 9-19
- [124]. Huang RX, Zhou PK. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):60
- [125]. Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 2005; 434: 605–11.
- [126]. Stucki M, Jackson SP. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)* 2006; 5: 534-543
- [127]. Lukas J, Lukas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 997–1007.
- [128]. Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 1993; 72: 131–42.
- [129]. Dvir A, Peterson SR, Knuth MW, Lu H, Dynan WS. Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11920–24.
- [130]. McKinnon PJ. ATM and the molecular pathogenesis of ataxia telangiectasia. *Annu Rev Pathol* 2012; 7: 303–21.
- [131]. Antoccia A, Kobayashi J, Tauchi H, Matsuura S, Komatsu K. Nijmegen breakage syndrome and functions of the responsible protein, NBS1. *Genome Dyn* 2006; 1:191–205.
- [132]. Rogers PB, Plowman PN, Harris SJ, Arlett CF. Four radiation hypersensitivity cases and their implications for clinical radiotherapy. *Radiother Oncol* 2000; 57: 143–54.
- [133]. Kumar V, Cotran RS, Robbins S. *Cell Injury, Death and Adaptation. Basic Pathology*, 6th Edition, WB Saunders Company 1997; Chapter 1.

- [134]. Thompson LH, Schild D. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res* 2001; 477: 131–53
- [135]. Tamulevicius P, Wang M, Iliakis G. Homology-directed repair is required for the development of radioresistance during S phase: interplay between double-strand break repair and checkpoint response. *Radiat Res* 2007; 167: 1–11
- [136]. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408: 433–39.
- [137]. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 39–85
- [138]. Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 2003; 22: 5834–47.
- [139]. Michael Fenech. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455 (2000) 81–95
- [140]. M. Fenech, A.A. Morley, Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios* 43 (1985) 233–246
- [141]. M. Fenech, A.A. Morley, Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* 147 (1985) 29–36.
- [142]. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674
- [143]. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643–649
- [144]. Carter SL, Cibulskis K, Helman E, McKenna A, Shen H, Zack T, Laird PW, Onofrio RC, Winckler W, Weir BA et al (2012) Absolut quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat Biotechnol* 30:413–42
- [145]. Cannan WJ, Pederson DS (2016) Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol* 231:3–14
- [146]. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12:162–169

- [147]. Guo X, Bai Y, Zhao M, Zhou M, Shen Q, Yun CH, Zhang H, Zhu WG, Wang J (2018) Acetylation of 53BP1 dictates the DNA double strand break repair pathway. *Nucleic Acids Res* 46:689–703
- [148]. Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X (2012) Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res* 40:5795–5818
- [149]. Schukken KM, Foijer F (2018) CIN and aneuploidy: different concepts different consequences. *Bioessays* 40(1):1700147
- [150]. Tanaka K, Hirota T (2016) Chromosomal instability: a common feature and a therapeutic target of cancer. *Biochim Biophys Acta* 1866:64–75
- [151]. He B, Gnawali N, Hinman AW, Mattingly AJ, Osimani A, Cimini D (2019) Chromosomes missegregated into micronuclei contribute to chromosomal instability by missegregating at the next division. *Oncotarget* 10:2660–2674
- [152]. Livezey KW, Negorev D, Simon D (2002) Increased chromosomal alterations and micronuclei formation in human hepatoma HepG2 cells transfected with the hepatitis B virus HBX gene. *Mutat Res* 505:63–74
- [153]. Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, Fenech M (2011) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 26:93–100
- [154]. Amato A, Lentini L, Schillaci T, Iovino F, Di Leonardo A (2009) RNAi mediated acute depletion of retinoblastoma protein (pRb) promotes aneuploidy in human primary cells via micronuclei formation. *BMC Cell Biol* 10:79
- [155]. Gayathri B, Kalyani R, Hemalatha A, Vasavi B (2012) Significance of micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma. *J Cytol* 29:236–240
- [156]. Kang C, Xu Q, Martin TD, Li MZ, Demaria M, Aron L, Lu T, Yankner BA, Campisi J, Elledge SJ (2015) The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5612>
- [157]. Huang Y, Jiang L, Yi Q, Lv L, Wang Z, Zhao X, Zhong L, Jiang H, Rasool S, Hao Q et al (2012) Lagging chromosomes entrapped in micronuclei are not “lost” by cells. *Cell Res* 22:932–935

- [158]. Hatch EM, Fischer AH, Deerinck TJ, Hetzer MW (2013) Catastrophic nuclear envelope collapse in cancer cell micronuclei. *Cell* 154:47–60
- [159]. Zhang CZ, Spektor A, Cornils H, Francis JM, Jackson EK, Liu S, Meyerson M, Pellman D (2015) Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* 522:179–184
- [160]. Ly P, Teitz LS, Kim DH, Shoshani O, Skaletsky H, Fachinetti D, Page DC, Cleveland DW (2017) Selective Y centromere inactivation triggers chromosome shattering in micronuclei and repair by non-homologous end joining. *Nat Cell Biol* 19:68–75
- [161]. Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, Murina O, Fluteau A, Simpson DJ, Olova N, Sutcliffe H, Rainger JK, Leitch A, et al.: cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature* 2017, 548:461–465. [PubMed: 28738408]
- [162]. Bartsch K, Knittler K, Borowski C, Rudnik S, Damme M, Aden K, Spehlmann ME, Frey N, Saftig P, Chalaris A, et al.: Absence of RNase H2 triggers generation of immunogenic micronuclei removed by autophagy. *Hum Mol Genet* 2017, 26:3960–3972. [PubMed: 29016854]
- [163]. McNairn AJ, Chuang CH, Bloom JC, Wallace MD, Schimenti JC: Female-biased embryonic death from inflammation induced by genomic instability. *Nature* 2019, 567:105–108. [PubMed:30787433]
- [164]. Leimbacher PA, Jones SE, Shorrocks AK, de Marco Zompit M, Day M, Blaauwendraad J, Bundschuh D, Bonham S, Fischer R, Fink D, et al.: MDC1 Interacts with TOPBP1 to Maintain Chromosomal Stability during Mitosis. *Mol Cell* 2019, 74:571–583 e578. [PubMed: 30898438]
- [165]. Bailey LJ, Bianchi J, Doherty AJ: PrimPol is required for the maintenance of efficient nuclear and mitochondrial DNA replication in human cells. *Nucleic Acids Res* 2019, 47:4026–4038. [PubMed:30715459]
- [166]. Pladevall-Morera D, Munk S, Ingham A, Garribba L, Albers E, Liu Y, Olsen JV, Lopez-Contreras AJ: Proteomic characterization of chromosomal common fragile site (CFS)-associated proteins uncovers ATRX as a regulator of CFS stability. *Nucleic Acids Res* 2019, 47:8004–8018. [PubMed:31180492]
- [167]. Rossi F, Helbling-Leclerc A, Kawasumi R, Jegadesan NK, Xu X, Devulder P, Abe T, Takata M, Xu D, Rosselli F, et al.: SMC5/6 acts jointly with

- Fanconi anemia factors to support DNA repair and genome stability. *EMBO Rep* 2020, 21:e48222. [PubMed: 31867888]
- [168]. Gratia M, Rodero MP, Conrad C, Bou Samra E, Maurin M, Rice GI, Duffy D, Revy P, Petit F, Dale RC, et al.: Bloom syndrome protein restrains innate immune sensing of micronuclei by cGAS. *J Exp Med* 2019, 216:1199–1213. [PubMed: 30936263]
- [169]. Traynor S, Mollegaard NE, Jorgensen MG, Bruckmann NH, Pedersen CB, Terp MG, Johansen S, Dejardin J, Ditzel HJ, Gjerstorff MF: Remodeling and destabilization of chromosome 1 pericentromeric heterochromatin by SSX proteins. *Nucleic Acids Res* 2019, 47:6668–6684. [PubMed: 31114908]
- [170]. Zhang W, Chen Z, Zhang D, Zhao B, Liu L, Xie Z, Yao Y, Zheng P: KHDC3L mutation causes recurrent pregnancy loss by inducing genomic instability of human early embryonic cells. *PLoS Biol* 2019, 17:e3000468. [PubMed: 31609975]
- [171]. Germann SM, Schramke V, Pedersen RT, Gallina I, Eckert-Boulet N, Oestergaard VH, Lisby M (2014) TopBP1/Dpb11 binds DNA anaphase bridges to prevent genome instability. *J Cell Biol* 204:45–59
- [172]. Hoffelder DR, Luo L, Burke NA, Watkins SC, Gollin SM, Saunders WS (2004) Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* 112:389–397
- [173]. Jennifer G, Brandon R, Melissa B.R, Daniel S, Keerthenan R, Laetitia A, Hong H. X, Amelia M. V, Daniel Josue G. O, Ivan V. Litvinov. Tools used to assay genomic instability in cancers and cancer meiomitosis. *Journal of Cell Communication and Signaling* (2022) 16:159–177 <https://doi.org/10.1007/s12079-021-00661-z>
- [174]. Josep V. F, Abderrahmane K. and Stephen P. J. Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nature Reviews-Cancer*, Volume 12. 2012
- [175]. de Groot, D.; Spanjaard, A.; Hogenbirk, M.A.; Jacobs, H. Chromosomal Rearrangements and Chromothripsis: The Alternative End Generation Model. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 794. <https://doi.org/10.3390/ijms24010794>
- [176]. Evans HJ, Neary GJ, Williamson FS. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the

effect of oxygen: Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *Int J Rad Biol.* 1959;3:216–29.

- [177]. Boller K, Schmid W. Chemische Mutagenese beim Sauger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als in vivo-testsystem. Haematologische befunde nach Behandlung mit Trenimon. *Humangenetik.* 1970;11:35–54
- [178]. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay: *Nat. Protoc.*, 2007, vol. 2, p. 1084-1104
- [179]. Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, Fenech M (2011) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 26:93–100
- [180]. Olaharski A, Sotelo R, Solorza-Luna G, Gonsebatt ME, Guzman P, Mohar A et al. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2006; 27: 3317-43.
- [181]. Simi S, Ballardini M, Casella M, De Marchi D, Hartwig V, Giovannetti G et al. Is the genotoxic effect of magnetic resonance negligible? Low persistence of micronucleus frequency in lymphocytes of individuals after cardiac scan. *Mutat Res*, 2008; 645: 39-43.
- [182]. Şekeroğlu V. Thiacloprid ve deltamethrin insektisitlerinin tek başlarına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman sıçan kemik iliği hücrelerinde in vivo genotoksik etkileri. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
- [183]. Chow LQM. Head and neck cancer. *New England Journal of Medicine* 2020; 382(1):60–72. doi:10.1056/NEJMra1715715
- [184]. Son E, Panwar A, Mosher CH, Lydiatt D. Cancers of the major salivary gland. *Journal of Oncology Practice* 2018; 14(2):99–10
- [185]. Sung H, Ferlay J, Siegel R L et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209–249
- [186]. Johnson D E, Burtneß B, Leemans C R, Lui V W Y, Bauman J E, Grandis J R. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020; 6: 92.

- [187]. Thomas S J, Penfold C M, Waylen A, Ness A R. The changing aetiology of head and neck squamous cell cancer: A tale of three cancers? *Clin Otolaryngol* 2018; 43: 999–1003
- [188]. Miranda-Filho A, Bray F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncol* 2020; 102: 104551.
- [189]. Bosetti C, Carioli G, Santucci C et al. Global trends in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 2020; 147: 1040–1049.
- [190]. Hashibe M, Brennan P, Chuang S-C et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 541–550
- [191]. Nicolotti N, Chuang S-C, Cadoni G et al. Recreational physical activity and risk of head and neck cancer: a pooled analysis within the international head and neck cancer epidemiology (INHANCE) Consortium. *Eur J Epidemiol* 2011; 26: 619–628
- [192]. Hashim D, Sartori S, Brennan P et al. The role of oral hygiene in head and neck cancer: results from International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Ann Oncol* 2016; 27: 1619–1625.
- [193]. Chuang S-C, Jenab M, Heck J E et al. Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Causes Control* 2012; 23: 69–88
- [194]. Hobbs C G L, Sterne J A C, Bailey M, Heyderman R S, Birchall M A, Thomas S J. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006; 31: 259–266.
- [195]. Vukovic V, Stojanovic J, Vecchioni A, Pastorino R, Boccia S. Systematic Review and Meta-analysis of SNPs from Genome-Wide Association Studies of Head and Neck Cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2018; 159: 615–624
- [196]. M.D. Mody, J.W. Rocco, S.S. Yom, R.I. Haddad, N.F. Saba Head and neck cancer *Lancet*, 398 (2021), pp. 2289-2299, 10.1016/S0140-6736(21)01550-6

- [197]. T.D. Shellenberger, R.S. Weber. Multidisciplinary team planning for patients with head and neck cancer Oral Maxillofac. Surg. Clin., 30 (2018), pp. 435-444, 10.1016/j.coms.2018.06.005
- [198]. Fregnani ER, Parahyba CJ, Morais-Faria K, Fonseca FP, Ramos PA, de Moraes FY, et al.. IMRT delivers lower radiation doses to dental structures than 3DRT in head and neck cancer patients. *Radiat Oncol* 2016; 11: 116.
- [199]. Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, et al.. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48: 7–16.
- [200]. Pignon JP, Bourhis J, Domenge CO, Designé LL, Mach-NC Collaborative Group. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. *The Lancet* 2000; 355: 949–955
- [201]. Afnan F. Alfouzan Radiation therapy in head and neck cancer - Saudi Medical Journal March 2021, 42 (3) 247-254; DOI:<https://doi.org/10.15537/smj.2021.42.3.20210660>
- [202]. Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, et al.. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol* 2003; 66: 253–262
- [203]. Rosenthal DI, Lewin JS, Eisbruch A.. Prevention and treatment of dysphagia and aspiration after chemoradiation for head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2636–2643
- [204]. Li G, Jiang Y, Li G, Qiao Q. Comprehensive analysis of radio-sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol* (2021) 159:126–35. doi: 10.1016/j.radonc.2021.03.017
- [205]. Liu C, Jin Y, Fan Z. The mechanism of warburg effect-induced chemoresistance in cancer. *Front Oncol* (2021) 11:698023. doi: 10.3389/fonc.2021.698023

- [206]. Takamitsu A Kato. Cytokinesis Blocked Micronuclei Aberration Analysis. *Methods Mol Biol* 2023;2519:83-91. doi: 10.1007/978-1-0716-2433-3_9.
- [207]. Węgierek-Ciuk, A, Lankoff, A.; Lisowska, H.; Kędzierawski, P.; Akuwudike, P.; Lundholm, L.; Wojcik, A. Cisplatin Reduces the Frequencies of Radiotherapy-Induced Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Gynaecological Cancer: Possible Implications for the Risk of Second Malignant Neoplasms. *Cells* 2021, 10, 2709. <https://doi.org/10.3390/cells1010270>
- [208]. Eastmond, D.A. & Tucker, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13, 34–43 (1989).
- [209]. Kron T. Reduction of margins in external beam radiotherapy. *J Med Phys* 2008;33:41-2.
- [210]. Sprung CN, Chao M, Leong T, McKay MJ. Chromosomal radiosensitivity in two cell lineages derived from clinically radiosensitive cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005;11:6352-8
- [211]. Popanda O, Ebbeler R, Twardella D, Helmbold I, Gotzes F, Schmezer P, et al. Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:1216-25
- [212]. Huber R, Braselmann H, Geinitz H, Jaehnert I, Baumgartner A, Thamm R, et al. Chromosomal radiosensitivity and acute radiation side effects after radiotherapy in tumour patients – A follow-up study. *Radiat Oncol* 2011;6:32
- [213]. Gamulin M, Kopjar N, Grgic M, Ramic S, Viculin T, Petkovic M, et al. Cytogenetic follow-up in testicular seminoma patients exposed to adjuvant radiotherapy. *Coll Antropol* 2010;34:455-65
- [214]. Greve B, Bölling T, Amler S, Rössler U, Gomolka M, Mayer C, et al. Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an

- inter-laboratory comparison – Lessons for future studies. *PLoS One* 2012;7:e47185
- [215]. Mozdarani H, Mansouri Z, Haeri SA. Cytogenetic radiosensitivity of g0-lymphocytes of breast and esophageal cancer patients as determined by micronucleus assay. *J Radiat Res* 2005;46:111-6.
- [216]. Pinn ME, Gold DG, Petersen IA, Osborn TG, Brown PD, Miller RC. Systemic lupus erythematosus, radiotherapy, and the risk of acute and chronic toxicity: The Mayo Clinic experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;71:498-506
- [217]. Pantelias GE, Terzoudi GI. A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity. *Radiother Oncol* 2011;101:28-34.
- [218]. Guogyte K, Plieskienė A, Ladygienė R, Ž, Sevriukova O, Janušonis V, et al. Assessment of correlation between chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes after In vitro irradiation and normal tissue side effects for cancer patients undergoing radiotherapy. *Genome Integr* 2017;8:1
- [219]. Bahadir B, Gulgun G. Seda E, Nuran S.B, Mehmet G. Decreased DNA repair gene XRCC1 expression is associated with radiotherapy induced acute side effects in breast cancer patients. *Gene* 582 (2016) 33-37
- [220]. Flavia Zita Francies, Olivia Herd, Alan Cairns, Sarah Nietz, Marshall Murdoch, Jacobus Slabbert, Kathleen B. M. Claes, Anne Vral & Ans Baeyens (2019) Chromosomal radiosensitivity of triple negative breast cancer patients, *International Journal of Radiation Biology*, 95:11, 1507-1516, DOI: 10.1080/09553002.2019.1649502
- [221]. Edvane Borges da Silva, Mariana Brayner Cavalcanti, Cátia Simone Ferreira Da Silva, Thiago de Salazar e Fernandes, Jonathan Azevedo Melo, Luciano Lucena, André Maciel Netto & Ademir Amaral (2021) Micronucleus assay for predicting side effects of radiotherapy for cervical cancer, *Biotechnic & Histochemistry*, 96:1, 60-66, DOI: 10.1080/10520295.2020.1759143
- [222]. Leif Hendrik Dröge, Steffen Hennies, Stephan Lorenzen , Lena-Christin Conradi, Henriette Quack Torsten Liersch , Christian Helms , Miriam Alice

- Frank, Markus Anton Schirmer, Margret Rave-Fränk, Tim Beißbarth and Hendrik Andreas Wolff. Prognostic value of the micronucleus assay for clinical endpoints in neoadjuvant radiochemotherapy for rectal cancer. Dröge et al. *BMC Cancer* (2021) 21:219 <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07914-5>
- [223]. Kerstin Borgmann a , Barbara Roper, Rafaat Abd El-Awady, Sophie Brackrock, Maika Bigalke, Tilo Dork , Winfried Alberti, Ekkehard Dikomey, Jochen Dahm-Daphi. Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiotherapy and Oncology* 64 (2002) 141–152
- [224]. Sema Burgaz, Erdem Coskun, Gonca Cakmak Demircigil, Neslihan Aygun Kocabas ,Faik Cetindag , Osman Sunter and Hayriye Edinsel. Micronucleus frequencies in lymphocytes and buccal epithelial cells from patients having head and neck cancer and their first-degree relatives. *Mutagenesis* vol. 26 no. 2 pp. 351–356, 2011 Advance Access Publication 19 January 2011
- [225]. Dilek Unal, Aslihan Kiraz, Deniz Avci, Arzu Tasdemir, Tuba Dilay Unal, Sedat Cagli, Celalettin Eroglu, Imdat Yuce, Ibrahim Ozcan & Bunyamin Kaplan (2016) Cytogenetic damage of radiotherapy in long-term head and neck cancer survivors, *International Journal of Radiation Biology*, 92:7, 364-370, DOI:10.1080/09553002.2016.1175680
- [226]. H. Hintzsche , B. Polat , V. Schewe, C.S. Djuzenova , L. Pfreundner , M. Flentje , H. Stopper. Micronucleus formation kinetics in buccal mucosa cells of head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *Toxicology Letters* 212 (2012) 33–37
- [227]. Soraya E. M, Hossein M, Morteza M, Mohsen M, and Seyed Mahmoud R. Aghamiri. Evaluation of Cytogenetic Alterations in Peripheral Blood Lymphocytes of Esophageal Cancer Patients Treated with Radiotherapy or Chemoradiotherapy using Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay. *Acta Medica Iranica*, Vol. 54, No. 1 (2016)



EKLER

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		
TİTCK-KAD-DZ	Tarih / Versiyon	Sayfa
	05.05.2019 / Ver3.0	1/5

ÇALIŞMANIN ADI: Küratif kemoradyoterapi uygulanan ve cerrahi sonrası radyoterapi uygulanan baş-boyun kanserli hastalarda sitogenetik hasarın mikronükleus yöntemiyle incelenmesi

Aşağıda bilgileri yer almakta olan bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini, olası yararları ve risklerini ya da rahatsızlık verebilecek yönlerini anlamamız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer çalışmaya katılma kararı verirseniz, **Çalışmaya Katılma Onayı Formu**'nu imzalayınız. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ödeme yapılmayacak ya da sizden herhangi bir maddi katkı/imalzama katkısı istenmeyecek sadece tedavi sırasında uygulanacak prosedür uygulanacaktır.

CALISMANIN KONUSU VE AMACI: Bu çalışmada Baş-Boyun kanseri nedeniyle kemoterapi ve radyoterapi birlikte uygulanan ve sadece radyoterapi uygulanan hastalarda radyasyon duyarlılığı araştırılmaktadır. Bunun için tedavinin farklı aşamalarında hastalardan kanlar alınarak CBMN (mikronükleus) yöntemiyle incelenecektir. Bu çalışmada amaç, kemo/radyoterapi sırasında normal dokuların en az etkilene ve oluşabilecek yan etkileri en aza indirmek için tedavi öncesi radyasyon dozlarının kişiye özgü belirlenmesidir.

CALISMAYA KATILMA KOSULLARI NEDİR?

Bu çalışmaya dahil edilebilmeniz için, baş-boyun kanseri tanılı olup, yenileme (nüks) veya uzak sıçrama (metastaz) saptanmayan ve tedavi olarak ya cerrahi sonrası radyoterapi, ya da cerrahi uygulanmadan kemoterapi ve radyoterapi birlikte tedavisi (kemo-radyoterapi) uygulanan bir hasta olmanız gerekmektedir.

CALISMADA KATILIMCI SAYISI ve SURESI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 20 olup çalışmanın süresi iki yıldır.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KÜRATİF KEMORADYOTERAPİ UYGULANAN ve CERRAHİ SONRASI RADYOTERAPİ UYGULANAN BAŞ-BOYUN KANSERLİ HASTALARDA SİTOGENETİK HASARIN MİKRONÜKLEUS YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% **10** BENZERLİK ENDEKSİ
 %8 İNTERNET KAYNAKLARI
 %2 YAYINLAR
 %2 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2
3	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
5	avesis.iuc.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	www.kanservakfi.com İnternet Kaynağı	<%1
7	Nurettin KONAR, Ahmet KURTOĞLU, Alperen ŞANAL, Edip KARAKUŞ. "Examination of the Effect of Power and Reaction Parameters of Wheelchair Basketball Teams on the League	<%1

